

Universidad Pública de Navarra

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE AROMAS EN ORUJOS DE UVA

presentado por

SARA FRAGO RAMOS

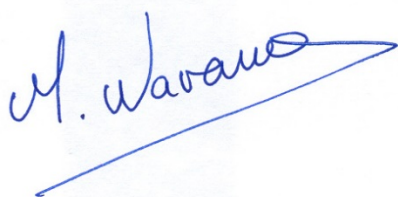
(e)k aurkeztua

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS
AGROALIMENTARIAS**

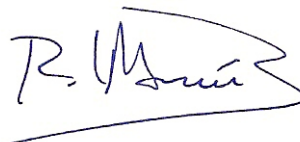
Septiembre, 2016

Pamplona, a 19 de septiembre de 2016

Dña. Montserrat Navarro Huidobro y Dña. M. Remedios Marín Arroyo, directoras del TFM realizado por Dña. **Sara Frago Ramos** y titulado **“Extracción y determinación de aromas en orujos de uva”**, autorizan su presentación.



Fdo: Montserrat Navarro Huidobro



Fdo: M. Remedios Marín Arroyo

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1. Orujos de uva	3
1.1.1. Vías de valorización de los orujos de uva	3
1.2. Composición aromática, clasificación y tipos de aroma de la uva y de los orujos de uva	4
1.2.1. Aromas libres y precursores aromáticos en orujos de uva	5
1.3. Extracción de aromas de los orujos de uva	7
1.3.1. Extracción sólido – líquido	7
1.3.2. Extracción en Fase Sólida (SPE)	7
1.3.3. Microextracción en fase sólida (SPME)	9
1.3.3.1. Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS – SPME)	10
1.3.4. Extracción por absorción en barra agitadora (SBSE)	10
1.4. Métodos analíticos empleados para la determinación de aromas	11
1.4.1. Determinación directa mediante cromatografía de gases	11
1.4.2. Determinación indirecta	11
2. OBJETIVOS	12
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Materia prima	16
4.2. Caracterización de los orujos de uva	16
4.2.1. Humedad	16
4.2.2. Acidez total	16
4.2.3. Grado alcohólico	16
4.2.4. Contenido en cenizas y alcalinidad de las cenizas	17

4.3. Procedimiento de extracción de aromas libres y precursores aromáticos glicosilados	17
4.3.1. Secado	17
4.3.1.1. Secado a vacío	17
4.3.1.2. Liofilización	18
4.3.2. Extracción sólido:líquido	18
4.4. Análisis de los aromas libres y precursores aromáticos	18
4.4.1. Extracción en fase sólida	18
4.4.2. Hidrólisis enzimática	19
4.4.3. Preconcentración de los extractos	19
4.4.4. Determinación cromatográfica	20
4.4.4.1. Equipo GC – MS	20
4.4.4.2. Equipo GC – FID	21
4.4.4.3. Cálculos para determinar la concentración de los aromas	22
4.5. Análisis estadístico	23
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1. Caracterización de las muestras de orujo de uva	24
5.2. Puesta a punto del método analítico	25
5.2.1. Optimización del procedimiento SPE	26
5.2.1.1. Optimización del volumen de elución	26
5.2.1.2. Optimización del volumen de carga en el cartucho SPE	29
5.3. Determinación de los factores de mayor influencia en la extracción de aromas	33
5.4. Optimización de las condiciones de extracción	41
6. CONCLUSIONES	48
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. 1. Aromas libres y precursores aromáticos en la uva	6
Tabla 3. 1. Valores de los factores utilizados en el diseño experimental (diseño factorial incompleto, media fracción: 2^4-1)	14
Tabla 3. 2. Diseño experimental para los orujos de uva secados a vacío y liofilizados	14
Tabla 3. 3. Valores de los factores utilizados en el diseño experimental (diseño central compuesto en estrella, 2^2 + estrella)	15
Tabla 3. 4. Diseño experimental de superficie de respuesta para orujos de uva secados a vacío	15
Tabla 4. 1. Condiciones cromatográficas de los análisis en el equipo GC – MS	20
Tabla 4. 2. Condiciones cromatográficas de los análisis en el equipo GC – FID	21
Tabla 4. 3. Niveles de concentración de aromas (mg/L) en el calibrado para GC - FID	22
Tabla 5. 1. Tabla resumen de las propiedades físico – químicas medidas para caracterizar las muestras de orujos de uva (valor promedio y desviación estándar)	24
Tabla 5. 2. Precursores aromáticos determinados en los orujos de uva extraídos con etanol:agua (50:50,v:v)	25
Tabla 5. 3. Condiciones experimentales del procedimiento SPE aplicando relaciones volumen carga:volumen de elución 1:1, 1:0.8, 2:1 y 5:1	27
Tabla 5. 4. Precursores aromáticos determinados en los orujos de uva extraídos con disolución tampón a pH 3 aplicando las relaciones volumen carga:volumen de elución 1:1, 1:0,8 y 2:1	28
Tabla 5. 5. Aromas libres determinados en los orujos de uva extraídos con disolución tampón a pH 3 aplicando las relaciones volumen carga:volumen de elución 1:1, 1:0,8, 2:1 y 5:1	28
Tabla 5. 6. Precursores aromáticos determinados en los orujos de uva extraídos con disolución tampón a pH 3 aplicando la relación volumen carga:volumen elución 1:0,8 (20 ml de carga)	30
Tabla 5. 7. Aromas libres determinados en los orujos de uva extraídos con disolución tampón a pH 3 aplicando la relación volumen carga:volumen elución 2:1	30
Tabla 5. 8. Resumen de los resultados obtenidos en la puesta a punto del método analítico	31

Tabla 5. 9. Valores de los factores utilizados en el diseño experimental (diseño factorial incompleto, media fracción: 2^{4-1})	34
Tabla 5. 10. Diseño experimental para los orujos de uva secados a vacío y liofilizados	35
Tabla 5. 11. Resultados del diseño experimental aplicado a la determinación de aromas libres en orujos de uva secados a vacío	36
Tabla 5. 12. Resultados del diseño experimental aplicado a la determinación de precursores aromáticos en orujos de uva secados a vacío	36
Tabla 5. 13. Resultados del diseño experimental aplicado a la determinación de aromas libres en orujos de uva liofilizados	37
Tabla 5. 14. Resultados del diseño experimental aplicado a la determinación de precursores aromáticos en orujos de uva liofilizados	37
Tabla 5. 15. Tabla resumen de los resultados del diseño experimental aplicado a orujos de uva secados a vacío	38
Tabla 5. 16. Tabla resumen de los resultados del diseño experimental aplicado a orujos de uva liofilizados	38
Tabla 5. 17. Valores de los factores utilizados en el diseño experimental (diseño central compuesto en estrella, 2^2 + estrella)	42
Tabla 5. 18. Diseño experimental para los orujos de uva secados a vacío	42
Tabla 5. 19. Resultados del diseño experimental de superficie de respuesta	43
Tabla 5. 20. Resumen de las concentraciones de aromas libres determinadas para los orujos de uva secados a vacío en el diseño experimental de superficie de respuesta	45
Tabla 5. 21.- R^2 y p-valor de la variable respuesta	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Porcentaje de aromas libres y de aromas procedentes de precursores glicosídicos en algunas viníferas neutras y aromáticas	4
Figura 1. 1. Esquema del procedimiento SPE	8
Figura 1. 2. Esquema del procedimiento SPME	9
Figura 1. 3. Esquema del procedimiento SBSE y desorción térmica posterior	10
Figura 4. 1. Procedimiento de extracción de aromas en orujos de uva	17
Figura 4. 2. Análisis de los aromas libres y precursores aromáticos	18
Figura 5. 1. Diagrama de Pareto y gráfica de efectos principales para la determinación de aromas libres en orujos secados a vacío	39
Figura 5. 2. Diagrama de Pareto y gráfica de efectos principales para la determinación de precursores aromáticos glicosilados en orujos secados a vacío	40
Figura 5. 3. Diagrama de Pareto y gráfica de efectos principales para la determinación de aromas libres en orujos liofilizados	40
Figura 5. 4. Diagrama de Pareto y gráfica de efectos principales para la determinación de precursores aromáticos glicosilados en orujos liofilizados	41
Figura 5. 5. Significación de la T^a y pH en la extracción de aromas en orujos secados a vacío	46
Figura 5. 6. Gráfica de superficie de respuesta correspondiente a la concentración de aromas libres en orujos de uva secados a vacío	47

ABREVIATURAS

AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
DI - SPME	Microextracción en fase sólida por inmersión
DSR	Desviación estándar relativa
DVB	Divinilbenceno
ETSIA	Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos
GC - FID	Cromatografía de gases con detector de ionización en llama
GC – MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GC – MS/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tandem
HPLC - IR	Cromatografía líquida de alta resolución con detección por índice de refracción
HPLC - UV	Cromatografía líquida de alta resolución con detección por espectrometría de absorción molecular (UV)
HS - SPME	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
PDMS	Polidimetilsiloxano
PI	Patrón interno
SBSE	Extracción por adsorción en barra agitadora
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
UV - Vis	Espectrofotometría ultravioleta visible

RESUMEN

Los orujos de uva son los principales subproductos generados en la vinificación. Existen diversas vías de valorización de estos residuos, destacando la extracción de polifenoles. Sin embargo, no se ha estudiado su composición aromática y las posibilidades de su recuperación. Con el fin de determinar el potencial aromático en orujos de uva de variedades tintas, se ha llevado a cabo un procedimiento experimental basado en una extracción verde empleando disoluciones acuosas y un análisis por cromatografía de gases, previo aislamiento de los aromas por extracción en fase sólida. Asimismo, se ha determinado que los factores de mayor influencia en la extracción de aromas en orujos secados a vacío y liofilizados son pH y temperatura, y se han fijado sus valores óptimos, correspondientes a un pH de 2,4 en el medio y una temperatura de 56 °C. Los compuestos volátiles más abundantes en los orujos estudiados son alcohol bencílico, 3-metil-butanol, 1-hexanol, ácido hexanoico, decanoato de metilo y hexadecanoato de metilo.

Palabras clave: orujos de uva, aromas libres, precursores aromáticos glicosilados, extracción sólido – líquido, extracción en fase sólida

ABSTRACT

Grape pomaces are the most important by-products generated in wine production. There are several options to valorise these wastes, highlighting the extraction of polyphenolic compounds. Nevertheless, its aromatic composition and the possibility to recover its volatile compounds, hasn't been studied yet. In order to determine the aromatic potential of red grape pomaces, an experimental procedure based on a green extraction by using aqueous solutions and an analysis by gas chromatography, previous isolation of the volatile compounds by solid phase extraction, has been carried out. In addition, it has been determined that the factors that affect significantly in the extraction of volatile compounds in vacuum dried and lyophilized grape pomaces are pH and temperature, established its optimum values as pH 2,4 in the medium and a temperature of 56 °C. The most abundant volatile compounds determined in the grape pomaces studied are benzyl alcohol, 3-methyl-butanol, 1-hexanol, hexanoic acid, methyl decanoate and methyl hexadecanoate.

Keywords: grape pomaces, free volatile compounds, glycosilated volatile compounds, solid – liquid extraction, solid phase extraction

ANTECEDENTES

1.1. Orujos de uva

Los orujos de uva son los principales subproductos generados en el proceso de vinificación. Representan el 20 % del total de 69 millones de toneladas de uva destinadas anualmente a la producción de vino, generándose entre 13 y 14 millones de toneladas de orujos de uva (Davidov-Pardo, Navarro, Arozarena, & Marin-Arroyo, 2014).

Los orujos de uva son ricos en fibra (47,2 - 50 %), proteínas (10 – 16,4 %), taninos (5 %) y cenizas (6,5 – 6,8 %). Los lípidos (6 – 11,4 %) presentes en los orujos se encuentran en las pepitas y están formados principalmente por ácidos grasos poliinsaturados. Contienen carbohidratos (29,2 g/100 g) en forma de pectina (4 g/100 g), fructosa (9 g/100 g) y glucosa (8 g/100 g) principalmente. Asimismo, los orujos contienen, tanto en las pieles como en las pepitas, antioxidantes de naturaleza polifenólica en su mayoría (resveratrol, flavonoides, antocianos, etc.) excepto tocoferol y β -carotenos. El contenido total de polifenoles y de taninos es de aproximadamente el 1,5 % y el 1,7 % respectivamente (Yu & Ahmedna, 2013; FEDNA, 2016; Sousa et al., 2014).

Los orujos de uva, según su origen, se clasifican en (López Vázquez, 2011):

- Orujos vírgenes o crudos, procedentes de la vinificación de variedades de uva blancas, en la que éstos se separan antes de que el mosto inicie su fermentación.
- Orujos semi – fermentados, los cuales fermentan parcialmente con el mosto y se separan antes de que finalice la fermentación.
- Orujos fermentados, que se obtienen en la elaboración de vinos tintos, en los que los orujos fermentan en contacto con el mosto a lo largo de todo el proceso. En este estudio se trabaja con este tipo de orujos.

1.1.1. Vías de valorización de los orujos de uva

La principal vía de aprovechamiento de los orujos de uva desde 1930 ha sido su uso en alimentación animal (Famuyiwa & Ough, 1982), especialmente en piensos de mantenimiento de rumiantes y en pienso para conejos, debido a su valor nutricional. No obstante, en la actualidad, sólo un 3 % de la producción se destina a alimentación animal. Por ello, han emergido en los últimos años nuevas vías de valorización de los orujos de uva, entre las que destacan la obtención compuestos bioactivos, principalmente polifenoles extraídos a partir de las pieles y pepitas de uva, para su posterior aplicación en cosméticos, en la industria farmacéutica y en aditivos alimentarios (Martinez et al., 2015; Tournour et al., 2015; Yu & Ahmedna, 2013). Las pieles de uva son ricas en antocianos y resveratrol, mientras que las semillas de uva contienen ácidos fenólicos, flavonoides y procianidinas. El interés que suscita la extracción de polifenoles se basa en los beneficios para la salud que presentan estos compuestos dada su actividad antioxidante, que deriva en actividades antimutagénicas, anticancerígenas, antiinflamatorias y prevención de enfermedades cardiovasculares.

Otra vía de valorización estudiada es la obtención de fibra alimentaria a partir de las pieles u hollejos, que contienen hasta un 75 % de fibra; siendo mayor este porcentaje en los orujos tintos que en los blancos. Asimismo, en la industria cosmética, el aceite obtenido a partir de las semillas, se emplea como ingrediente en los productos cosméticos para reparar los tejidos cutáneos dañados (Yu & Ahmedna, 2013).

Como vía de valorización energética, se ha planteado la obtención de biogás por digestión anaerobia. De igual forma, los orujos de uva son precursores adecuados para la obtención de ácidos grasos volátiles (VFAs), a partir de los cuales se pueden generar biopolímeros como los polihidroxialcanoatos (PHAs), generados de forma natural por diversos microorganismos. Sin embargo, los rendimientos obtenidos y el coste económico asociado impiden su desarrollo a nivel industrial. Por ello, en el estudio realizado por Martínez et al. (2015), se propone un esquema de biorrefinería multi-propósito para el aprovechamiento integral de los orujos de uva mediante la extracción de polifenoles y posterior obtención de ácidos grasos volátiles, polihidroxialcanoatos y biogás.

1.2. Composición aromática, clasificación y tipos de aroma de la uva y de los orujos de uva

El potencial aromático de la uva depende principalmente de la variedad de uva (Y.Z. Gunata, Bayonove, Baumes, & Cordonnier, 1985), las condiciones edafo – climáticas (Sabon, De Revel, Kotseridis, & Bertrand, 2002), las prácticas agronómicas (Fragasso et al., 2002), la aplicación de tratamientos fitosanitarios (González-Rodríguez, Noguerol-Pato, González-Barreiro, Cancho-Grande, & Simal-Gándara, 2011) y las características de la zona de cultivo de la viña.

Los compuestos responsables del aroma pueden encontrarse en su forma libre, como compuestos volátiles; o ligados a otras moléculas, es decir, como precursores aromáticos, los cuales no son volátiles. Como se muestra en la Figura 1.1, la proporción de aromas libres y de precursores aromáticos varía sustancialmente de unas variedades a otras; siendo los aromas procedentes de los precursores más abundantes que los aromas libres.

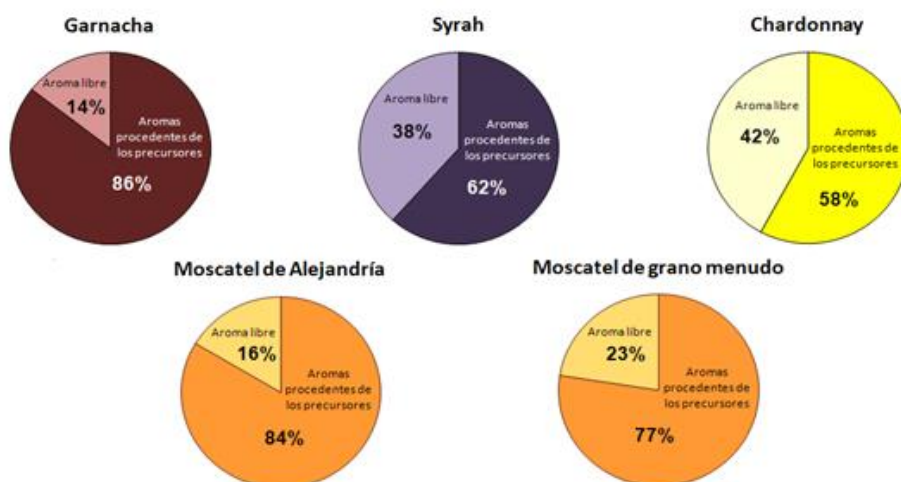


Figura 1. 1. Porcentaje de aromas libres y de aromas procedentes de precursores glicosídicos en algunas viníferas neutras y aromáticas (Serrano-de-la-Hoz & Salinas, 2015)

El proceso de vinificación afecta a la composición aromática de la uva. El aroma del vino es consecuencia de la combinación del aroma varietal, y de los aromas fermentativo y post-fermentativo. El primero procede de la propia uva, y corresponde a una parte importante del potencial aromático de ésta, que aporta al vino una personalidad aromática particular; el aroma fermentativo se genera por la acción de las levaduras durante la fermentación alcohólica y de las bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica. El aroma post – fermentativo incluye todos los compuestos volátiles que se forman durante el envejecimiento del vino, dando lugar al “buquet” (Serrano de la Hoz, 2014). Por lo tanto, los orujos de uva presentan un potencial aromático inferior al inicial de la uva, pero aun así interesante como vía de valorización de los mismos.

A continuación, se detallan los aromas libres y precursores aromáticos que se pueden encontrar en los orujos de uva.

1.2.1. Aromas libres y precursores aromáticos en orujos de uva

Las familias en las que se clasifican los aromas libres son alcoholes, terpenos, ésteres, aldehídos y cetonas y ácidos, como se muestra en la Tabla 1.2. A pesar de que la concentración de cada una de las familias de aromas depende de la variedad de uva, los aromas mayoritarios en general son alcoholes (132 – 3500 µg/kg) y aldehídos (16 – 116 µg/kg), destacando el alcohol bencílico (16 – 24 µg/kg), 2-feniletanol (40,5 – 3000 µg/kg), 1-hexanol (30 – 422 µg/kg), 1-octanol (15 µg/kg), 3-metil-butan-1-ol (8,4 µg/kg) y hexanal (59 µg/kg); seguidos por los ácidos (59 – 166 µg/kg), terpenos (50 - 73 µg/kg), y ésteres (16 – 24 µg/kg) en orden descendente de concentración (Canuti et al., 2009; Genovese, Gambuti, Lamorte, & Moio, 2013; Ghaste et al., 2015).

Los precursores aromáticos se clasifican en precursores específicos del aroma y precursores no específicos del aroma. Dentro de la primera categoría se encuentran los precursores glicosídicos y los S-conjugados, y entre los precursores no específicos destacan los aminoácidos, que durante la fermentación alcohólica producen compuestos volátiles que no son característicos de la variedad de uva. Por ello, los precursores específicos del aroma, mayoritariamente glicosilados, son los que otorgan la tipicidad varietal. Los compuestos volátiles que se pueden liberar de los precursores glicosídicos son de la misma naturaleza que los aromas libres, destacando los alcoholes y terpenos, como se muestra en la Tabla 1.2. Al igual que en los aromas libres, los precursores aromáticos glicosilados más abundantes son alcoholes (488 - 13580 µg/kg), destacando el alcohol bencílico (260 – 3710 µg/kg) y 2-feniletanol (112 - 9420 µg/kg). Los terpenos (83 – 3126 µg/kg) mayoritarios son óxido de linalol piránico (16 µg/kg) y geraniol (16 µg/kg) (Genovese et al., 2013; Ghaste et al., 2015).

Tabla 1. 1. Aromas libres y precursores aromáticos en la uva (Canuti et al., 2009; Genovese et al., 2013)

Familia	Compuestos	
Alcoholes	1-butanol ^{[1][2]}	2-metil-propanol ^[2]
	3-metil-butanol ^{[1][2]}	1-octanol ^{[1][2]}
	1-pentanol ^{[1][2]}	3-octanol ^[1]
	4-metil-pentanol ^{[1][2]}	1-octen-3-ol ^[1]
	1-hexanol ^{[1][2]}	1-nonanol ^[1]
	cis-3-hexenol ^{[1][2]}	(Z)-3-nonenol ^{[1][2]}
	trans-2-hexenol ^{[1][2]}	1-feniletanol ^{[1][2]}
	trans-3-hexenol ^{[1][2]}	2-feniletanol ^{[1][2]}
	1-heptanol ^{[1][2]}	Alcohol bencílico ^{[1][2]}
	2-heptanol ^[1]	Eugenol ^[1]
	4-metil-3-pentenol ^[2]	
Terpenos	Óxido de trans - linalool ^{[1][2]}	Geraniol ^{[1][2]}
	Óxido de cis - linalool ^{[1][2]}	exo-2-hidroxi-1,8-cineol ^{[1][2]}
	linalool ^[2]	ácido geránico ^[1]
	α -terpinol ^{[1][2]}	β -linalool ^[1]
	óxido de linalol piránico ^{[1][2]}	β -damascenona ^[1]
	β -citronelol ^{[1][2]}	β -ionona ^[1]
	nerol ^{[1][2]}	
Ésteres	etil butanoato ^[1]	etil glutarato ^[1]
	3-etil-metilbutanoato ^[1]	dietil succinato ^[1]
	etil hexanoato ^[1]	2-etil-fenilacetato ^[1]
	etil decanoato ^[1]	
Aldehídos y cetonas	benzaldehído ^[1]	2-octanona ^[1]
	hexanal ^[1]	3-octanona ^[1]
	(Z)-2-hexenal ^[1]	nonanal ^[1]
	(E)-2hexenal ^[1]	(E)-2-nonenal ^[1]
	4-metil-2-heptanona ^[1]	Furfural ^[1]
Ácidos	ácido hexanoico ^[1]	ácido octanoico ^[1]

Estos compuestos se pueden encontrar en la uva como:

^[1] Aromas libres ^[2] Precursores aromáticos glicosilados

1.3. Extracción de aromas de los orujos de uva

1.3.1. Extracción sólido – líquido

La extracción sólido - líquido es una operación unitaria mediante la cual se separan uno o más componentes solubles presentes en una muestra sólida, empleando para ello un disolvente adecuado para extraer selectivamente los compuestos de interés. Los factores que afectan de forma más significativa en este tipo de extracción son el tamaño de partícula del sólido, el disolvente de extracción, la temperatura y la agitación; de forma que un tamaño de partícula pequeño, el uso de un disolvente selectivo, una temperatura de trabajo elevada dentro del rango óptimo y agitación de la mezcla, aumentan la eficiencia de la extracción (Ullaauri, 2010).

En el ámbito alimentario, el disolvente de extracción seleccionado debe estar incluido en el Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio, por el que se aprueba la lista positiva de los disolventes de extracción que se pueden utilizar en la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes. Además del agua, los disolventes que, de acuerdo a la normativa, se pueden emplear respetando las buenas prácticas de fabricación para todos los usos son propanol, butanol, acetato de etilo, etanol, anhídrido carbónico, acetona y protóxido de nitrógeno. Para otros disolventes como hexano, acetato de metilo, metiletilcetona, diclorometano, metanol, 2- propanol y éter dimetílico, las condiciones de utilización son más restrictivas.

En los relacionados con la extracción de aromas en uvas y, en pieles y pepitas por separado, los disolventes que se han empleado son agua destilada o agua MilliQ con ácido ascórbico o gluconolactona, que actúan como agentes antioxidantes (Canuti et al., 2009; Ghaste et al., 2015; Vrhovsek et al., 2014), mezclas agua:etanol en distintas proporciones (Genovese et al., 2013; López, Ezpeleta, Sánchez, Cacho, & Ferreira, 2004), solución tampón de acetato a pH 5 (Diéguez, Lois, Gómez, & de la Peña, 2003), solución tampón fosfato a pH 7 (Noguerol-Pato, González-Álvarez, González-Barreiro, Cancho-Grande, & Simal-Gándara, 2013) y solución tampón a pH 3 (Genovese et al., 2013).

1.3.2. Extracción en Fase Sólida (SPE)

La extracción en fase sólida es una técnica de aislamiento y preconcentración desarrollada en los años 80. Se basa en la retención selectiva de determinados componentes de una muestra en el relleno de un cartucho, que posteriormente se eluyen con un determinado disolvente. Dependiendo del tipo de sorbente empleado y de las características de los analitos de interés, se producen una serie de interacciones físico – químicas que permiten separar los analitos del resto de compuestos de la muestra.

El procedimiento SPE consta de las siguientes etapas, que aparecen representadas en la Figura 1.2:

- *Acondicionamiento y equilibrado del cartucho*: se hace pasar a través del cartucho un determinado volumen de un disolvente fuerte, como metanol o acetonitrilo y, posteriormente, el mismo volumen de un disolvente débil, generalmente agua.

- *Carga de la muestra:* se hace pasar la muestra a través del cartucho SPE, de modo que los analitos de interés queden retenidos en la fase reversa. Este es, junto con la elución, uno de los puntos clave de este procedimiento; por lo que es necesario optimizar el volumen de carga de acuerdo a las características del cartucho y de la propia muestra.
- *Lavado:* para eliminar las interferencias que se hayan podido retener en el cartucho, se hace pasar un determinado volumen de agua a través del mismo, de forma que los analitos de interés sean, idealmente, los únicos retenidos en la fase reversa.
- *Elución de los analitos:* para desorber los analitos de la fase reversa en la que están retenidos, se hace pasar un determinado volumen de uno o varios disolventes fuertes, adecuados para la elución de los compuestos de interés.

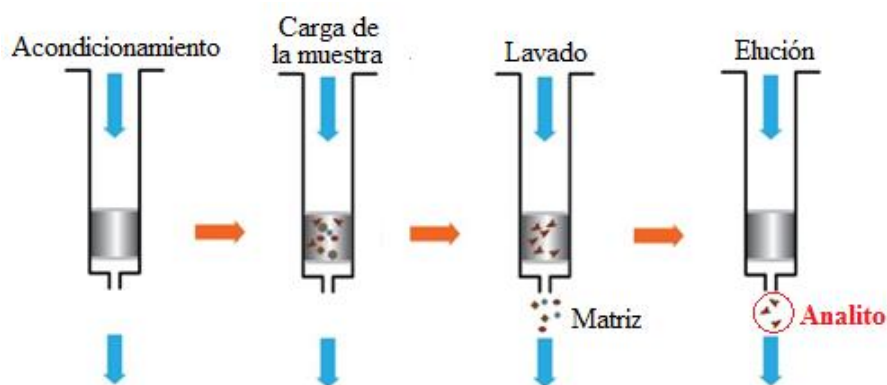


Figura 1. 2. Esquema del procedimiento SPE (15 de julio de 2016, de <http://toxicocb.blogspot.com.es/2013/10/las-intoxicaciones-con-farmacos.html>)

Existen actualmente dos tipos de sorbente para el relleno del cartucho; por un lado, los cartuchos de silicagel y, por otro lado, los cartuchos de relleno polimérico. Los primeros presentan una capacidad de retención menor y un consumo de disolvente y tiempo superiores. Asimismo, en ocasiones se puede producir la adsorción irreversible de los analitos o la degradación de los mismos dada la menor estabilidad a valores de pH extremos en este tipo de cartuchos. Los segundos, principalmente basados en copolímeros de estireno – divinilbenceno, no presentan los inconvenientes de los cartuchos de silicagel y, además, se pueden emplear tanto en fase normal como en fase reversa (Castro, Natera, Durán, & García-Barroso, 2008).

En el campo de la alimentación, esta técnica se ha aplicado principalmente como tratamiento previo para aislar los analitos de interés en la determinación de aromas y en la determinación de pesticidas (Castro, Natera, Durán, & García-Barroso, 2008; Picó, Fernández, Ruiz, & Font, 2007).

1.3.3. Microextracción en fase sólida (SPME)

SPME es una técnica de extracción desarrollada por Pawliszyn en torno a 1990. Se basa en establecer un equilibrio de reparto del analito entre una fase estacionaria polimérica y la matriz de la muestra. Las principales ventajas que presenta frente a SPE son:

- No requiere el uso de disolventes orgánicos.
- El procedimiento es rápido y asequible.
- Permite extraer y preconcentrar simultáneamente.
- Se necesitan volúmenes de muestra bajos.
- Puede acoplarse fácilmente a equipos de cromatografía líquida y gaseosa.
- Se puede emplear con muestras sólidas, líquidas y gaseosas.

El procedimiento SPME consta de dos fases, la extracción y la posterior desorción de los analitos de interés:

- Extracción de los analitos: la muestra, situada en un vial sellado con un septum, se pone en contacto con la fibra en la que se adsorben los compuestos de interés por inmersión en la disolución (DI – SPME) o en el espacio de cabeza (HS – SPME) durante un cierto periodo de tiempo.
- Desorción de los analitos: se extrae la fibra del vial y se acopla al inyector del sistema cromatográfico, ya sea HPLC o GC, y a medida que se desorben térmicamente los compuestos, éstos entran a la columna cromatográfica para su separación e identificación (por espectrometría de masas mayoritariamente).

El recubrimiento de la fibra determina en gran parte los analitos que pueden ser separados durante la extracción. Existen tres tipos principales de fibras, incluyendo la apolar de polidimetilsiloxano (PDMS), las semipolares de mezcla polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS- DVB) y las polares de carbowax- divinilbenceno y carbowax-resina templada. La naturaleza de los analitos de interés determina qué tipo de fibra ha de emplearse. Las fibras de polidimetilsiloxano, que tienen área superficial mayor, son las más empleadas para la extracción de compuestos volátiles (Balasubramanian & Panigrahi, 2011; Berrocal, 2012; Castro, Natera, Durán, & García-Barroso, 2008).



Figura 1. 3. Esquema del procedimiento SPME (Serrano de la Hoz, 2014)

1.3.3.1. Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS – SPME)

En la determinación de aromas, la modalidad HS–SPME está más extendida que DI – SPME debido que, con la extracción en el espacio de cabeza, sólo los compuestos volátiles se adsorben en la fibra; eliminándose así interferencias debidas a compuestos de elevado peso molecular y sustancias no volátiles en general. Se aplica en el análisis de muestras sólidas como alimentos, sedimentos o muestras biológicas, pero está restringido a compuestos volátiles o semivolátiles.

En el análisis de aromas en vino y en uva, el aislamiento de los compuestos aromáticos se realiza en muchos casos por HS – SPME (Canuti et al., 2009; Coelho, Rocha, Delgadillo, & Coimbra, 2006; Yang, Wang, Wu, Fang, & Li, 2011; Xu et al., 2015).

1.3.4. Extracción por absorción en barra agitadora (SBSE)

La técnica SBSE es una técnica de separación desarrollada a principios de los años 90s, basada en la adsorción sobre una fibra, generalmente PDMS. Se asemeja a la técnica SPME y presenta sus mismas ventajas, pero en este caso sólo puede aplicarse a muestras líquidas y gaseosas, pero no a sólidos. Presenta una mayor sensibilidad analítica, alcanzándose límites de detección y cuantificación más bajos puesto que la cantidad de PDMS en esta técnica es mayor, por lo que la capacidad extractiva también lo es. Sin embargo, su principal desventaja es la limitada capacidad de extracción que posee sobre sustancias polares, dado el marcado carácter apolar del PDMS, único absorbente utilizado hasta la fecha.

El procedimiento en SBSE es muy similar a SPME:

- *Extracción de los analitos:* la extracción se realiza por inmersión de una barra agitadora recubierta de PDMS en el interior de un vial que contiene la muestra. Alrededor del vial se colocan imanes que facilitan la agitación de la barra en el interior de la muestra. De esta forma, durante un cierto tiempo, los compuestos de interés se adsorben en la fibra de PDMS.
- *Desorción de los analitos:* se extrae la barra agitadora del vial y se introduce en un sistema de desorción térmica acoplado al inyector del cromatógrafo de gases; de modo que los compuestos se desorben y entran a la columna cromatográfica para su separación e identificación, generalmente por espectrometría de masas (GC – MS).

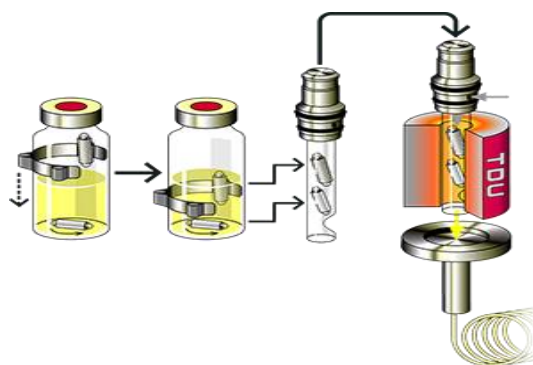


Figura 1. 4. Esquema del procedimiento SBSE y desorción térmica posterior
(15 de julio de 2016, de http://www.gerstel.es/es/GSW15_Flavor_Analysis.htm)

La extracción de aromas en uva por SBSE está en auge, como lo demuestran los estudios elaborados por Martínez-Gil, Garde-Cerdán, Zalacain, Pardo-García, & Salinas (2012), Pedroza, Zalacain, Lara, & Salinas (2010) y Salinas, Zalacain, Pardo, & Alonso (2004).

1.4. Métodos analíticos empleados para la determinación de aromas

La determinación y caracterización de los aromas se realiza generalmente mediante técnicas cromatográficas, generalmente cromatografía de gases. No obstante, la cuantificación de los precursores aromáticos glicosilados en particular se puede realizar de forma indirecta mediante la determinación de glucosa por espectrometría UV – vis y HPLC – UV.

1.4.1. Determinación directa mediante cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una de las técnicas más empleadas en la actualidad para el análisis de sustancias volátiles en distintas matrices orgánicas dada su amplia capacidad de separación. Las principales aplicaciones de esta técnica se centran en la industria petrolífera, muestras medioambientales y la industria alimentaria (López & Cacho, 2011).

El análisis de aromas, en particular de compuestos volátiles en vinos, uvas y orujos de uva, se lleva a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC – MS), a espectrometría de masas en tándem (GC – MS/MS) y con detección de ionización en llama (GC – FID) (Cedrón Fernández, 2004; Panighel & Flamini, 2014; Pedroza et al., 2010; Vrhovsek et al., 2014). La técnica más extendida para el análisis de compuestos volátiles en alimentos y bebidas es GC – MS gracias a su capacidad para confirmar la identidad química y estructural que se requiere en la mayoría de los análisis; mientras que con un detector de ionización en llama (FID) sólo se detecta la presencia de los distintos componentes de la muestra, pero no identifica el compuesto (Stashenko & Martínez, 2010).

1.4.2. Determinación indirecta

La concentración de precursores aromáticos glicosilados se puede relacionar con la concentración de glucosa liberada en la hidrólisis de los precursores. Sin embargo, tanto la glucosa libre como los polifenoles presentes en la uva actúan a modo de interferencia en el análisis; por lo que en un principio, esta metodología se aplicaba a uvas de variedades blancas exclusivamente. Sin embargo, aplicando una extracción en fase sólida previa a la hidrólisis de los precursores aromáticos, se consigue eliminar la interferencia por compuestos polifenólicos; lo que posibilita el análisis en uvas de variedades tintas. Asimismo, la glucosa libre se elimina empleando el reactivo de Fehling, que produce una reacción redox en la que el aldehído de la glucosa se oxida al ácido correspondiente y el Cu^{2+} del reactivo de Fehling se reduce a Cu^0 que precipita (M. R. Salinas, de la Hoz, Zalacain, Lara, & Garde-Cerdán, 2012; Serrano de la Hoz, 2014). En los estudios realizados por Serrano de la Hoz, la determinación de la glucosa liberada se realiza por HPLC – UV y por espectrofotometría UV visible.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la determinación del potencial aromático de los orujos de uva en variedades de uva tintas como nueva vía de valorización de subproductos vitivinícolas.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Diseñar un procedimiento de extracción sólido – líquido de los aromas libres y precursores aromáticos glicosilados presentes en los orujos de uva, empleando disolventes o mezclas de disolventes aprobados para la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes, de acuerdo al Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio.
2. Poner a punto del método analítico mediante la optimización de un procedimiento de Extracción en Fase Sólida (SPE) para la recuperación de los aromas libres y precursores glicosilados presentes en los extractos y su adecuación para la determinación analítica mediante GC – MS.
3. Determinar los factores de mayor influencia en la extracción sólido-líquido y fijar las condiciones de extracción que permitan optimizar la recuperación de aromas en los orujos.
4. Determinar los principales compuestos volátiles, tanto en forma de aromas libres como de precursores aromáticos glicosilados, recuperados en los orujos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental que se ha llevado a cabo y se describe en esta memoria se divide en cuatro fases, que se detallan a continuación:

1ª Fase: Caracterización de las muestras de orujo de uva

En esta primera fase se han caracterizado los orujos de uva con los que se trabaja, a través de la medida de distintas propiedades físico – químicas.

Se han llevado a cabo 5 análisis distintos, correspondientes a las propiedades físico – químicas medidas:

- Humedad
- Acidez total
- Grado alcohólico
- Contenido en cenizas
- Alcalinidad de las cenizas

Cada análisis se ha realizado por triplicado.

2ª Fase: Puesta a punto del método analítico

En esta segunda fase se ha llevado a cabo la puesta a punto del método analítico, que engloba la extracción de aromas y el análisis de los mismos.

Para ello, se ha partido de las condiciones experimentales descritas por Genovese et al., (2013), empleando como disolvente de extracción etanol:agua (50:50, v:v).

En relación a la extracción de aromas, se han empleado dos disolventes de extracción distintos, etanol:agua (50:50, v:v) y disolución tampón de ácido cítrico a pH 3; ambos autorizados para uso alimentario.

En el análisis de los aromas previamente extraídos, se han modificado las condiciones de la extracción en fase sólida, variando el volumen de carga en el cartucho y la relación volumen de carga:volumen de elución:

- Los volúmenes de carga con los que se han trabajado han sido 10 ml, 20 ml, 30 ml y 50 ml.
- Las relaciones volumen de carga:volumen de elución estudiadas han sido 1:1, 1:0,8, 2:1 y 5:1.

Se han realizado dos análisis cromatográficos de cada una de las muestras, uno con la fracción de aromas libres extraídos y otro con la fracción de precursores aromáticos extraídos.

3ª Fase: Determinar los factores de mayor influencia en la extracción de aromas

En esta tercera fase se ha investigado la influencia de los factores tamaño de partícula, pH, temperatura y relación sólido/líquido en la extracción de aromas en orujos de uva secados a vacío y liofilizados.

Para ello, se han realizado en total 16 experimentos, 8 con orujos de uva secados a vacío y 8 con orujos liofilizados, llevando a cabo un diseño factorial incompleto de tipo media fracción 2^{4-1} , aleatorizado y sin repeticiones (Tabla 3.2). Los factores estudiados son tamaño de partícula, pH, temperatura y relación sólido solvente en los valores que se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3. 1. Valores de los factores utilizados en el diseño experimental (diseño factorial incompleto, media fracción: 2^{4-1})

Valor	Tamaño de partícula (mm)	pH	Temperatura (°C)	Relación sólido:solvente
-1	$0,20 < x < 0,45$	3	20	1:3
1	$0,71 < x < 2,50$	6	50	1:7

Tabla 3. 2. Diseño experimental para los orujos de uva secados a vacío y liofilizados

Prueba	Tamaño de partícula	pH	T ^a (°C)	Relación sólido:solvente
1	1,0	-1,0	-1,0	1,0
2	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,0	-1,0	1,0	-1,0
4	1,0	1,0	-1,0	-1,0
5	-1,0	-1,0	1,0	1,0
6	-1,0	1,0	-1,0	1,0
7	-1,0	1,0	1,0	-1,0
8	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0

Se han realizado dos análisis cromatográficos de cada una de las muestras, uno con la fracción de aromas libres extraídos y otro con la fracción de precursores aromáticos extraídos.

4ª Fase: Determinación de las condiciones óptimas de extracción de los aromas de los orujos de uva

En esta cuarta fase, se ha determinado el espacio experimental de los factores pH y temperatura, que son los dos factores con mayor influencia en la extracción de aromas en los orujos de uva, con el fin encontrar las mejores condiciones de extracción para maximizar el aprovechamiento del potencial aromático de los orujos secados a vacío.

Para ello, se han realizado en total 16 experimentos, llevando a cabo un diseño central compuesto en estrella 2^2 + estrella (Tabla 3.4). Los valores de pH y temperatura con los que se ha trabajado se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3. 3. Valores de los factores utilizados en el diseño experimental (diseño central compuesto en estrella, 2^2 + estrella)

Valor	Temperatura (°C)	pH
- 1,41	14	2,4
-1	20	3
0	35	4,5
1	50	6
1,41	56	6,6

Tabla 3. 4. Diseño experimental de superficie de respuesta para orujos de uva secados a vacío

Prueba	Temperatura (°C)	pH	Prueba	Temperatura (°C)	Ph
1	0,0	1,41	9	-1,0	-1,0
2	0,0	-1,41	10	0,0	0,0
3	0,0	0,0	11	-1,41	0,0
4	1,0	1,0	12	1,41	0,0
5	0,0	0,0	13	0,0	0,0
6	0,0	0,0	14	0,0	0,0
7	0,0	0,0	15	0,0	0,0
8	1,0	-1,0	16	-1,0	1,0

Se ha realizado un análisis cromatográfico de cada una de las muestras, correspondiente a la fracción de aromas libres extraídos.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materia prima

Los orujos utilizados en este estudio proceden de la vinificación en tinto de uvas de las variedades garnacha y graciano procedentes de la finca de prácticas de la ETSIA.

El proceso de vinificación seguido comprende las siguientes operaciones: estrujado, despalillado, sulfitado, encubado a 25 °C con remontados diarios durante 8 días, descube y, finalmente, prensado de los orujos escurridos.

Los orujos obtenidos tras el prensado se han almacenado en bolsas de congelación a -25 °C hasta el momento de su uso.

4.2. Caracterización de los orujos de uva

4.2.1. Humedad

La humedad se determina empleando la balanza de humedad (GRAM ST-H50). Para ello, se toman entre 2 y 5 gramos de orujos de uva y la medida se realiza por triplicado.

4.2.2. Acidez total

La acidez total de los orujos de uva se debe principalmente al ácido tartárico presente en la uva. Se determina de acuerdo al método oficial AOAC 942.15 (2005), por valoración potenciométrica, empleando NaOH 0,1 M como agente valorante.

La preparación de la muestra se realiza de acuerdo al método oficial AOAC 920.149 (2005), de modo que se toman 150 g de orujos y se mezclan con 400 ml de agua destilada. La mezcla se lleva a ebullición durante 1 hora, reponiendo cada cierto tiempo el agua evaporada. Finalmente, tras enfriar la mezcla, se lleva a un matraz de 1 L, se enrasa a ese volumen y se filtra, desechando el sólido obtenido. Para la valoración potenciométrica se toman alícuotas de 100 ml y se realiza el análisis por triplicado.

Representando el volumen de agente valorante adicionado frente al pH, se determina el punto de equivalencia y, a partir de él, la concentración de ácido tartárico en los orujos de uva (g ácido/100 g de orujos).

4.2.3. Grado alcohólico

Para determinar el grado alcohólico de los orujos se sigue el método empleado para el vino, recogido en el Reglamento (CEE) n° 2676/90, modificado para adecuarlo a la matriz de estudio. Por ello, se toman 20 g de orujos de uva, 200 ml de agua destilada, se homogeneiza y tritura la muestra y se añaden 10 ml de Ca(OH)₂ 2M.

Se destila la mezcla, recogiendo en un matraz un volumen equivalente a $\frac{3}{4}$ partes del volumen inicial, es decir, 150 ml de destilado. Una vez atemperado a 20 - 25 °C, se enrasa a 200 ml y se lleva a cabo la determinación areométrica del grado alcohólico de los orujos.

El valor indicado en el areómetro ha de corregirse con el factor de corrección de temperatura, de acuerdo a la temperatura de la muestra en el momento de la medida y el valor del grado alcohólico determinado. A partir del valor corregido, se determina el % de etanol en los orujos de uva teniendo en cuenta el volumen de alcohol en el destilado obtenido, la densidad del etanol y el peso de orujos empleado. El resultado final se expresa en % de etanol en masa.

4.2.4. Contenido en cenizas y alcalinidad de las cenizas

La determinación de las cenizas se realiza de acuerdo al método oficial AOAC 940.26 (2005). Se toman 10 g de muestra previamente secadas en estufa y se calcinan a 525 °C en una mufla. Se pesa el residuo obtenido (cenizas) para comprobar la pérdida de masa por la oxidación de la materia orgánica a CO₂ y pérdida de humedad residual.

Posteriormente, para determinar la alcalinidad de las cenizas, se realiza una valoración por retroceso; de forma que tras la adición de un exceso de HCl 0,1 M, se valora este exceso con NaOH como agente valorante y empleando naranja de metilo como indicador, que vira en el rango de pH de 3,1 - 4,4 (rojo a pH < 3,1 y naranja – amarillo a pH > 4,4). La alcalinidad se expresa como el volumen de HCl (en ml) necesario para neutralizar los compuestos de carácter básico presentes en las cenizas.

4.3. Procedimiento de extracción de aromas libres y precursores aromáticos glicosilados

El procedimiento de extracción de aromas en los orujos de uva se realiza de acuerdo a la Figura 4.1:



Figura 4. 1. Procedimiento de extracción de aromas en orujos de uva

4.3.1. Secado

4.3.1.1. Secado a vacío

Previamente al secado, los orujos de uva se muelen hasta dejar una masa uniforme. Para el secado a vacío se utiliza una secadora a vacío BINDER a las condiciones de 50 °C y a una presión de 150 mbar.

El tiempo de secado viene determinado por la humedad final requerida, que ha de ser menor del 5 %. Por ello, cada 2,5 horas se toma una porción de la muestra y se determina la humedad. El tiempo de secado experimental es de 7,5 horas, de forma que la humedad de los orujos es del 4,79 %.

4.3.1.2. Liofilización

Los orujos de uva se liofilizan en un equipo semi-industrial LYOBETA-25 en las siguientes condiciones:

- Tiempo total de proceso: 22 horas
- Congelación: desde temperatura inicial a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 30 minutos. Mantener a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 horas
- Secado primario: de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 30 minutos, a vacío (0,250 mbar). Mantener a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0,250 mbar durante 11 horas

La humedad de las muestras tras el proceso ha de ser menor que el 5 % y la humedad de los orujos liofilizados es del 4,95 %.

4.3.2. Extracción sólido:líquido

Para la extracción sólido:líquido, se pesan 50 gramos de orujos de uva y se trituran con la ayuda de una batidora durante unos minutos para facilitar la extracción de los aromas, tanto libres como glicosilados.

Las muestras (50 g) se mezclan con el disolvente de extracción (disolución tampón a pH 3 o etanol:agua (50:50, v:v)) y la mezcla se macera durante 2 horas en agitación constante a 300 rpm. El extracto resultante se centrifuga durante 20 minutos a $10.000\times g$ y a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una centrífuga SIGMA 3K30. Se recoge el sobrenadante y se dopa con 200 μl de 1-heptanol (300 mg/l), obteniéndose una concentración de patrón interno en el extracto de 1,2 mg/L. Éste es el extracto final que se carga en el cartucho SPE.

4.4. Análisis de los aromas libres y precursores aromáticos

El procedimiento seguido para el análisis de los aromas extraídos se muestra en la Figura 4.2:

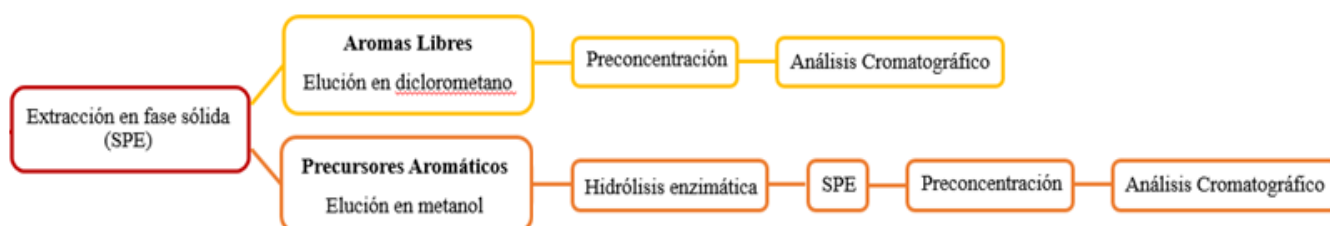


Figura 4. 2. Análisis de los aromas libres y precursores aromáticos

4.4.1. Extracción en fase sólida

A lo largo del procedimiento experimental se realizan dos extracciones SPE, una de ellas tras la extracción de los aromas a partir de los orujos (SPE 1), y otra tras la hidrólisis enzimática de los precursores aromáticos aislados (SPE 2).

El cartucho empleado en este trabajo es de fase reversa (C – 18) de Sep - Pak, con 360 mg de relleno de sílica, con un tamaño de partícula y poro de 55 – 105 μm y 125Å respectivamente, y un volumen de retención de 0,7 ml. Los volúmenes necesarios para el acondicionamiento, equilibrado y lavado vienen determinados por el volumen de retención del cartucho, siendo el óptimo de 6 a 10 veces este volumen de retención.

Sin embargo, los volúmenes de carga de muestra y de elución dependen de diversos factores tanto del propio cartucho (selectividad del adsorbente, cantidad y tamaño de partícula del adsorbente, volumen de retención del cartucho y capacidad de retención del cartucho), como inherentes a la muestra (naturaleza química y concentración de los analitos en la muestra, tipo de matriz, fuerza del disolvente que conforma el medio y pH de la muestra).

El procedimiento de extracción en fase sólida se detalla a continuación:

- Acondicionamiento y equilibrado del cartucho empleando 5 ml de metanol y de agua destilada respectivamente.
- Carga de 20 ml del extracto de orujos de uva [SPE 1] o del extracto aromático hidrolizado [SPE 2].
- Lavado con 10 ml de agua destilada.
- Elución de los aromas libres y los precursores aromáticos en 10 ml de diclorometano (LiChrosolv) y 16 ml de metanol (VWR Chemicals) respectivamente [SPE 1], y de los precursores aromáticos hidrolizados en 8 ml de diclorometano [SPE 2].

4.4.2. Hidrólisis enzimática

Para la hidrólisis de los precursores aromáticos, en primer lugar, se evapora el disolvente, metanol, en rotavapor (Büchi) y el sólido resultante se resuspende en 5 mL de una disolución tampón citrato:fostato a pH 5. Posteriormente se adicionan 80 mg de la enzima glucosidasa (Enovin Varietal, Agrovin), que posee actividad poligalacturonasa, pectinliasa, pectinmetilestearasa y β -glucosidasa. La mezcla obtenida se incuba a 40 °C durante 16 horas en agitación constante a 150 rpm, siguiendo el procedimiento descrito por Genovese (2013).

Una vez finalizada la hidrólisis, antes de la extracción en fase sólida, el extracto hidrolizado se dopa con 20 μL de 1-heptanol (PI), de forma que la concentración del mismo en el extracto sea de 1,2 mg/L.

4.4.3. Preconcentración de los extractos

Previamente al análisis, los extractos se preconcentran por evaporación del disolvente, bajo corriente de nitrógeno; de forma que el volumen final de las muestras a analizar sea de 100 μL , recogido en un vial de 1 ml.

4.4.4. Determinación cromatográfica

4.4.4.1. Equipo GC – MS

Para el análisis de los aromas presentes en los extractos, se toma 1 µl del vial y se procede a la determinación cromatográfica empleando un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5980 Series II) acoplado a un detector de espectrometría de masas (Hewlett Packard 5971 Series Mass Selective Detector).

Este equipo se ha empleado en las fases del diseño experimental correspondientes a la puesta a punto del método analítico y la determinación de los factores de mayor influencia en la extracción de aromas.

Las condiciones cromatográficas en las que se realizan los análisis se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4. 1. Condiciones cromatográficas de los análisis en el equipo GC – MS

Columna cromatográfica	columna capilar TR-WAX (60 m, Di 0,25 mm y 0,25 µm de tamaño de partícula)
Fase móvil	Helio
Velocidad de flujo	0,8 ml/min
Presión de cabeza	15 kPa (equivale a 25 Psi)
Modo de inyección	Splitless
Temperatura de inyección	220 °C
Rampa de temperatura	60 °C – 1 min Rampa de 4 °C/min 220 °C – 30 min
Temperatura del detector	280 °C
Ionización	Bombardeo electrónico
Energía de ionización	70 Ev
Temperatura de ionización	175 °C
Analizador de masas	Cuadrapolo
Temperatura del analizador	150 °C

4.4.4.2. Equipo GC – FID

Para el análisis de los aromas presentes en los extractos, se toma 1 µl del vial y se procede a la determinación cromatográfica empleando un cromatógrafo de gases con detección de ionización en llama (Hewlett Packard 5980 Series II).

Este equipo se ha empleado en las fases del diseño experimental correspondientes a la puesta a punto del método analítico y la determinación de los factores de mayor influencia en la extracción de aromas.

Las condiciones cromatográficas en las que se realizan los análisis se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4. 2. Condiciones cromatográficas de los análisis en el equipo GC – FID

Columna cromatográfica	Columna semicapilar Suprawax 280 (30 m, Di 0,53 mm y 1,0 µm de tamaño de partícula)
Fase móvil	Helio
Velocidad de flujo He	30 ml/min
Velocidad de flujo aire	300 ml/min
Velocidad de flujo H₂	30 ml/min
Modo de inyección	Splitless
Temperatura de inyección	180 °C
Rampa de temperatura	50 °C – 2 min
	Rampa de 10 °C/min
	148 °C – 10 min
Temperatura del detector	200 °C

En este equipo, la identificación de los compuestos separados se realiza de forma indirecta a través de la comparación de los tiempos de retención con los de los patrones de pureza cromatográfica correspondientes a los compuestos presentes en los extractos a determinar. La cuantificación de los aromas se realiza por el método del patrón interno basándose en el área de pico y la concentración de 1-heptanol.

Se ha preparado un patrón de aromas a dos niveles de concentración que se muestra en la Tabla 4.3; a partir del cual se han determinado, para cada aroma, las curvas de calibración que se emplean para la cuantificación de los aromas en los extractos.

Tabla 4. 3. Niveles de concentración de aromas (mg/L) en el calibrado para GC - FID

Concentración (mg/L)		
Compuesto	Nivel 1	Nivel 2
acetaldehído	70	140
2-butanol	70	140
1-butanol	70	140
acetato de hexilo	300	600
lactato de etilo	3000	6000
cis-3-hexenol	300	600
octanoato de etilo	300	600
benzaldehído	300	600
ácido isobutírico	300	600
γ -butirolactona	3000	6000
succinato de dietilo	1000	2000
glutarato de dietilo	300	600
3-metil-butanol	300	600
2-feniletanol	300	600
ácido hexanoico	300	600
1-heptanol (P.I.)	200	200

4.4.4.3. Cálculos para determinar la concentración de los aromas

Las concentraciones de los aromas libres en los orujos de uva se han calculado por comparación de las áreas respecto al área del P.I (asumiendo que el factor de respuesta de los compuestos analizados es el mismo que el del P.I) que, al añadirse al extracto previo a la extracción analítica por SPE, sigue el mismo tratamiento que los aromas presentes en la muestra. Por ello, se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración aromas libres } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \frac{\% \text{ Área pico del compuesto} \cdot \text{Concentración del PI en el extracto } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{\% \text{ Área pico del PI}} \cdot \frac{\text{Volumen extracto (L)}}{\text{Peso seco de orujos de uva (kg)}}$$

Las concentraciones de precursores aromáticos en los orujos de uva se han calculado por comparación de áreas respecto al área de pico del P.I, asumiendo que el factor de respuesta de los compuestos analizados es el mismo que el del P.I. Por ello, para determinar la concentración de precursores en los orujos, se calculan los gramos de cada precursor libreado en el extracto hidrolizado; que corresponden a los gramos retenidos en el cartucho SPE cuando se carga el extracto inicial. Por lo tanto, la cuantificación de los precursores aromáticos se realiza a partir de la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Concentración precursores aromáticos } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) &= \\ &= \frac{\% \text{ Área pico del compuesto} \cdot \text{Concentración del PI en el extracto } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{\% \text{ Área pico del PI}} \\ &\cdot \frac{\text{Volumen extracto hidrolizado (L)} \cdot \text{Volumen extracto cargado en SPE (L)}}{\text{Volumen total del extracto (L)} \cdot \text{Peso seco de orujos de uva (kg)}} \end{aligned}$$

4.5. Análisis estadístico

Para analizar los resultados obtenidos en el diseño factorial y en el modelo de superficie de respuesta, se emplea el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de las muestras de orujo de uva

En esta primera parte del trabajo se han determinado los parámetros físico – químicos a través de los cuales se pueden caracterizar los orujos de uva que se están estudiando.

Las propiedades físico – químicas que se miden son la humedad, la acidez total, el grado alcohólico, el contenido en cenizas y la alcalinidad de las cenizas, de acuerdo a los métodos expuestos en el apartado 4.2 de esta memoria.

Se han realizado tres repeticiones de cada medida, de las cuales se muestra el valor promedio y la desviación estándar (desvest) en la Tabla 5.1.

Tabla 5. 1. Tabla resumen de las propiedades físico – químicas medidas para caracterizar las muestras de orujos de uva (valor promedio y desviación estándar)

	Promedio	Desvest
Humedad (%)	47,53	0,52
Acidez total (g ácido tartárico/100 g orujos de uva)	0,45	0,02
Grado alcohólico (% etanol, m/m)	6,66	1,17
Contenido en cenizas (%)	6,87	0,24
Alcalinidad de las cenizas (ml de HCl necesarios para neutralizar 1 g de cenizas)	71,18	7,93

La humedad de los orujos es comparable a la humedad de los orujos de destilería, que se encuentra en torno al 45 - 55 % (Fernández, 2006).

La acidez total de los orujos aquí determinada se compara con los datos obtenidos en el estudio elaborado por Sousa et al. (2014), correspondiente a $0.64 \pm 0,004$ g ácido cítrico/100g (equivalente a $0,56 \pm 0,004$ g ácido tartárico/100g). Por lo tanto, se comprueba que la acidez de los orujos es comparable a la del estudio.

El grado alcohólico determinado en los orujos estudiados es algo menor del promedio de riqueza alcohólica de los orujos fermentados, correspondiente al 9 % (Ministerio de Agricultura, 1979).

El contenido en cenizas de los orujos estudiados se compara con los datos obtenidos en el estudio elaborado por Pop et al. (2015), en el cual se determina que éste es del $6,51 \pm 0,07$ %. Como se puede observar, ambos datos son equivalentes. Respecto a la alcalinidad de las cenizas, no se han encontrado datos que se puedan comparar con los obtenidos en este estudio.

5.2. Puesta a punto del método analítico

En un estudio preliminar, realizado con el fin de determinar si el método analítico diseñado es adecuado para la extracción y determinación de aromas libres y precursores aromáticos en orujos de uva, se ha llevado a cabo la extracción sólido:líquido con la mezcla etanol:agua (50:50, v:v) como disolvente, siguiendo el procedimiento experimental descrito por Genovese et al. (2013). De esta forma, se han cargado 50 ml del extracto en el cartucho SPE y los aromas libres y los precursores aromáticos se han eluido en 50 ml de diclorometano y metanol respectivamente.

En la Tabla 5.2 se muestran los resultados del análisis cromatográfico de los precursores aromáticos. La fracción correspondiente a los aromas libres no se ha analizado debido a la coloración de la misma, amarilla en lugar de incolora, que denota la presencia de polifenoles que han quedado retenidos en el cartucho y no se han eliminado en la fase de limpieza del cartucho; por lo que se han eluido con diclorometano junto con los aromas libres extraídos.

Tabla 5. 2. Precursores aromáticos determinados en los orujos de uva extraídos con etanol:agua (50:50,v:v)

Determinación de precursores aromáticos	
Compuesto	Concentración (mg/kg)
alcohol bencílico	0,25
hexadecanoato de metilo	0,24
2,4-bis-(1,1-dimetil)-fenol	0,34
TOTAL	0,84

A partir de los resultados obtenidos en esta primera prueba, se comprueba que el método analítico seguido permite extraer y analizar aromas presentes en los orujos de uva. No obstante, el uso de etanol:agua como disolvente de extracción imposibilita la determinación de los aromas libres debido a la presencia de polifenoles en las muestras de análisis. Por ello, en estas condiciones, el método analítico es adecuado para la determinación de precursores aromáticos glicosilados exclusivamente.

Asimismo, es necesario optimizar las condiciones del procedimiento SPE con el fin de adecuarlo a las características del cartucho y de los extractos de orujos de uva con los que se trabaja. Por ello, en el siguiente apartado de la memoria se determinan los volúmenes de elución y de carga óptimos, así como la relación volumen de carga:volumen de elución correspondiente.

5.2.1. Optimización del procedimiento SPE

5.2.1.1. Optimización del volumen de elución

En la bibliografía consultada se emplean cartuchos de mayor capacidad, con rellenos de 500 mg a 1 g, por lo que es necesario optimizar el volumen de elución a las características del cartucho empleado en este estudio (360 mg de relleno).

El volumen de elución en SPE depende de diversos factores, entre los que destacan el volumen de retención del cartucho, la polaridad de los analitos que se quieren eluir y la polaridad o fuerza del disolvente de elución elegido.

Independientemente del disolvente de elución empleado y de la polaridad de los analitos, el volumen de elución mínimo ha de ser dos veces el volumen muerto del cartucho. En este caso, dado que se emplea un cartucho C – 18 con 360 mg de relleno y un volumen de retención de 0,7 ml, el volumen de elución mínimo ha de ser de 1,5 ml – 2 ml.

Por ello, se ha realizado una experiencia con el fin de hallar el menor volumen de elución que permita la recuperación cuantitativa de los aromas aislados en SPE. Para ello, se han extraído los aromas con etanol:agua (50:50, v/v), se ha cargado el extracto completo (50 ml) en el cartucho SPE y se han eluido tanto los aromas libres como los precursores aromáticos en cinco fracciones consecutivas de 2 ml, de modo que el volumen de elución total ha sido de 10 ml de diclorometano y 10 ml de metanol. Asimismo, en la extracción en fase sólida que se lleva a cabo tras la hidrólisis de los precursores aromáticos glicosidados, los aromas se han eluido en dos fracciones consecutivas de 3 ml de diclorometano, de modo que el volumen de elución final ha sido de 6 ml.

No obstante, en el análisis cromatográfico de las fracciones correspondientes a los precursores aromáticos no se ha encontrado ningún pico correspondiente a aromas presentes en los orujos. Por lo tanto, se deduce que la concentración de precursores aromáticos en los extractos se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica. Se ha repetido la experiencia para comprobar si se observan diferencias, pero en ninguna de las dos pruebas se han determinado precursores aromáticos.

Asimismo, al igual que en la prueba anterior, las fracciones correspondientes a los aromas libres extraídos no se han podido analizar debido a la presencia de polifenoles (las muestras de análisis presentan coloración amarilla, indicativo de su presencia).

Tras examinar todos los resultados obtenidos en esta prueba, se ha concluido que los volúmenes de elución seleccionados han sido insuficientes para eluir los compuestos aromáticos.

De igual modo, puesto que independientemente del volumen de elución empleado en la fracción de aromas libres se eluyen también las catequinas retenidas en el cartucho, impidiendo la determinación y caracterización de los aromas libres presentes en los orujos de uva, se ha realizado una revisión bibliográfica de los disolventes de extracción empleados en estudios similares.

De acuerdo a la bibliografía consultada, para la extracción de aromas en uvas, pieles de uva y pepitas, se emplean mayoritariamente:

- Mezclas de etanol:agua en distintas proporciones, principalmente etanol:agua (50:50, v:v) (Genovese, Gambuti, Lamorte, & Moio, 2013; Pedroza, Zalacain, Lara, & Salinas, 2010; Salinas, de la Hoz, Zalacain, Lara, & Garde-Cerdán, 2012).
- Agua destilada o milli-Q con gluconolactona o ácido ascórbico, que actúan como antioxidantes (Canuti et al., 2009; Ghaste et al., 2015; Vrhovsek et al., 2014).
- Disolución tampón a pH 3,2 (Genovese et al., 2013).
- Hexano (Ruberto, Renda, Amico & Tringali, 2008), que no está autorizado para uso alimentario.
- Dióxido de azufre (SO₂) (Pedroza et al., 2010).

De todas las opciones anteriores, el disolvente elegido ha sido la disolución tampón acuosa de ácido cítrico a pH 3, autorizada para la fabricación de productos alimenticios y de sus ingredientes (Real Decreto 1101/2011 de 22 de julio).

Con el fin de comprobar si hay diferencias en la extracción y análisis de los aromas empleando etanol:agua (50:50, v:v) o la disolución tampón a pH 3, se ha llevado a cabo una nueva experiencia en las condiciones expuestas en la Tabla 5.3. En ella, se ha estudiado también qué relación volumen de carga:volumen de elución es la más adecuada en este estudio, partiendo de un volumen de carga menor que en las anteriores pruebas.

Tabla 5. 3. Condiciones experimentales del procedimiento SPE aplicando relaciones volumen carga:volumen de elución 1:1, 1:0.8, 2:1 y 5:1

Disolvente de extracción	Etanol:agua (50:50, v/v)	Disolución tampón a pH 3
Muestra cargada en SPE	10 ml	10 ml
Volumen elución (diclorometano y metanol)	G1 y L1 - 10 ml	GA1 y LA1 - 10 ml
	G2 y L2 - 8 ml	GA2 y LA2 - 8 ml
	G3 y L3 - 5 ml	GA3 y LA3 - 5 ml
	G4 y L4 - 2 ml	GA4 y LA4 - 2 ml
Relación volumen carga:volumen elución	G1 y L1 – 1:1	GA1 y LA1 – 1:1
	G2 y L2 – 1:0,8	GA2 y LA2 – 1:0,8
	G3 y L3 – 2:1	GA3 y LA3 – 2:1
	G4 y L4 – 5:1	GA4 y LA4 – 5:1

G: precursores - extracción con etanol:agua (50:50, v:v)

GA: precursores - extracción con disolución tampón a pH 3

L: aromas libres - extracción con etanol:agua (50:50, v:v)

LA: precursores - extracción con disolución tampón a pH 3

Empleando etanol:agua (50:50, v:v) como disolvente de extracción, en el análisis de las fracciones G₁ a G₄, no se detectan aromas, lo que se atribuye a que la concentración de mismos se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica. Asimismo, las fracciones libres L₁ a L₄ no se han podido analizar por la presencia de polifenoles (coloración amarilla del eluato).

Sim embargo, empleando la disolución tampón a pH 3, se podido determinar y caracterizar tanto los precursores aromáticos como los aromas libres presentes en los orujos de uva (Tablas 5.4 y 5.5). Con este disolvente se ha eliminado la presencia de polifenoles en la fracción de aromas libres ya que en medio acuoso la extracción polifenólica es menor que en medios hidroalcohólicos (Davidov-Pardo et al., 2014).

En relación a la elución de precursores aromáticos, el volumen de elución de 2 ml (relación volumen de carga:volumen de elución 5:1) es insuficiente y sólo se eluyen los polifenoles retenidos en el cartucho (eluato con coloración violácea); por lo que esta fracción no se ha analizado en ninguno de los dos casos (G4 y GA4).

Tabla 5. 4. Precursores aromáticos determinados en los orujos de uva extraídos con disolución tampón a pH 3 aplicando las relaciones volumen carga:volumen de elución 1:1, 1:0,8 y 2:1

Determinación de los precursores aromáticos			
	Relación volumen de carga:volumen de elución		
	1:1	1:0,8	2:1
Compuesto	Concentración (mg/kg)	Concentración (mg/kg)	Concentración (mg/kg)
Linalool	ND	0,16	ND
1- α -terpinol	ND	0,07	ND
alcohol bencílico	0,64	0,39	0,26
ácido octanoico	ND	0,11	0,10
decanoato de metilo	0,57	0,53	0,63
TOTAL	1,22	1,26	1,00

ND: Compuesto no detectado

Tabla 5. 5. Aromas libres determinados en los orujos de uva extraídos con disolución tampón a pH 3 aplicando las relaciones volumen carga:volumen de elución 1:1, 1:0,8, 2:1 y 5:1

Determinación de los aromas libres				
	Relación volumen de carga:volumen de elución			
	1:1	1:0,8	2:1	5:1
Compuesto	Concentración (mg/kg)	Concentración (mg/kg)	Concentración (mg/kg)	Concentración (mg/kg)
3-metil-butanol	11,09	19,55	20,87	19,94
1-hexanol	0,73	1,07	1,11	1,21
butanodiato de etilo	0,43	0,51	0,52	0,42
ácido hexanoico	0,35	0,52	0,53	ND
alcohol bencílico	9,91	20,45	18,98	16,25
TOTAL	22,50	42,09	42,00	37,81

ND: Compuesto no detectado

Comparando los resultados obtenidos con cada uno de los disolventes de extracción en la determinación de los aromas libres, se observa que empleando la disolución tampón a pH 3 el eluato correspondiente a los aromas libres es incoloro, de modo que se ha eliminado la interferencia debida a la presencia de polifenoles.

Comparando los resultados obtenidos con cada uno de los disolventes de extracción en la determinación de los precursores aromáticos, se observa que empleando la disolución tampón a pH 3, la concentración de estos aromas en las muestras de análisis se encuentran por encima del límite de detección de la técnica, por lo que se puede caracterizar la composición aromática de los orujos. Por lo tanto, dado que en las referencias bibliográficas ambos disolventes son adecuados para la extracción de precursores aromáticos, el problema se encuentra en el procedimiento de extracción en fase sólida. Atendiendo a la fuerza de elución de los disolventes, el etanol tiene una fuerza intermedia mientras que las disoluciones acuosas son muy débiles. Por ello, se puede deducir que al cargar los extractos en el cartucho SPE, empleando como disolvente de extracción etanol:agua (50:50, v:v) los aromas no quedan lo suficientemente retenidos en el cartucho y eluyen. Sin embargo, empleando como disolvente de elución la disolución tampón a pH 3, al cargar el extracto, los aromas quedan retenidos en el mismo hasta su posterior elución.

Igualmente, comparando los resultados obtenidos aplicando las cuatro relaciones volumen de carga:volumen de elución estudiadas:

- Las concentraciones de precursores aromáticos determinadas aplicando las relaciones 1:1 y 1:0,8 son muy similares. Sin embargo, se caracteriza un número mayor de aromas con la menor relación. Por lo tanto, se concluye que en la determinación de precursores aromáticos, se aplica una relación volumen de carga:volumen de elución de 1:0,8 independientemente del volumen de carga.
- Las concentraciones de aromas libres determinadas aplicando las relaciones 1:0,8 y 2:1 son equivalentes y los aromas caracterizados coinciden en ambos casos y a concentraciones muy similares. Por lo tanto, se concluye que, en la determinación de aromas, se aplica una relación volumen de carga:volumen de elución de 2:1 independientemente del volumen de carga, con el fin de emplear un volumen de disolvente (diclorometano) menor.

5.2.1.2. Optimización del volumen de carga en el cartucho SPE

En la experiencia anterior, los picos cromatográficos obtenidos en los análisis de los aromas libres y, especialmente, de los precursores aromáticos son pequeños. Para intentar aumentarlos, se han realizado experiencias con el fin de determinar cuál es el volumen de carga más adecuado. Se ha llevado a cabo una nueva experiencia cargando en los cartuchos SPE 20 y 30 ml del extracto de aromas respectivamente. Se han mantenido las relaciones volumen de carga:volumen de elución optimizadas para los aromas libres (2:1) y los precursores aromáticos (1:0,8).

No se plantean volúmenes de carga mayores dado que el cartucho se obtura fácilmente y, al aumentar el volumen de carga, se dificulta el paso de la muestra a través del cartucho.

Los resultados obtenidos en esta experiencia se muestran en la Tabla 5.6 y 5.7.

Tabla 5. 6. Precursores aromáticos determinados en los orujos de uva extraídos con disolución tampón a pH 3 aplicando la relación volumen carga:volumen elución 1:0,8 (20 ml de carga)

Determinación de los precursores aromáticos	
Compuesto	Concentración (mg/kg)
3-metil-butanol	0,46
1-pentanol	0,10
Benzaldehído	0,06
alcohol bencílico	0,30
hexadecanoato de metilo	0,29
2,6-bis-(1,1-dimetiletil)-fenol	0,14
ácido bis-(2-metil)-1,2-bencenodicarboxílico	0,10
TOTAL	1,45

Tabla 5. 7. Aromas libres determinados en los orujos de uva extraídos con disolución tampón a pH 3 aplicando la relación volumen carga:volumen elución 2:1

Determinación de los aromas libres		
	Vcarga = 20 ml	Vcarga = 30 ml
Compuesto	Concentración (mg/kg)	Concentración (mg/kg)
3-metil-butanol	17,67	5,54
1-octanol	0,00	1,47
1-hexanol	1,80	ND
butanodiato de etilo	0,71	ND
3-hidroxi-butanoato de etilo	0,59	ND
ácido hexanoico	0,68	ND
alcohol bencílico	22,79	18,00
ácido octanoico	0,61	0,00
TOTAL	46,05	26,21

ND: Compuesto no detectado

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta experiencia, el volumen de carga óptimo es de 20 ml, puesto que permite determinar aromas libres y precursores aromáticos en una concentración mayor y los picos cromatográficos son más grandes.

Un volumen de carga de 30 ml es muy elevado y no se retienen adecuadamente todos los aromas extraídos de los orujos, posiblemente porque la propia matriz de los extractos se retiene en mayor medida que a volúmenes de carga menores, saturándose el cartucho fácilmente; lo que explica que la concentración de aromas libres determinada haya sido mucho menor que con 20 ml y, que los precursores aromáticos se encuentren presentes en la muestra de análisis por debajo del límite de detección de la técnica.

A modo de resumen de la fase de puesta a punto del método analítico, en la Tabla 5.8 se muestran todos los resultados obtenidos en las distintas experiencias junto con las condiciones experimentales en las que se han llevado a cabo.

Tabla 5. 8. Resumen de los resultados obtenidos en la puesta a punto del método analítico

Vcarga (ml)	Velución aromas libres (ml)	Velución precursores (ml)	Disolvente de extracción	[Aromas libres] (mg/kg)	[Precursores] (mg/kg)
50	50	50	Etanol:agua (50:50, v:v)	NA*	0,84
50	2	2	Etanol:agua (50:50, v:v)	NA*	ND
50	4	4	Etanol:agua (50:50, v:v)	NA*	ND
50	6	6	Etanol:agua (50:50, v:v)	NA*	ND
50	8	8	Etanol:agua (50:50, v:v)	NA*	ND
50	10	10	Etanol:agua (50:50, v:v)	NA*	ND
10	2	2	Etanol:agua (50:50, v:v)	NA*	ND
10	5	5	Etanol:agua (50:50, v:v)	NA*	ND
10	8	8	Etanol:agua (50:50, v:v)	NA*	ND
10	10	10	Etanol:agua (50:50, v:v)	NA*	ND
10	2	2	Disolución tampón pH 3	37,81	NA**
10	5	5	Disolución tampón pH 3	42,00	1,00
10	8	8	Disolución tampón pH 3	42,09	1,26
10	10	10	Disolución tampón pH 3	22,50	1,22
20	10	16	Disolución tampón pH 3	46,05	1,45
30	15	24	Disolución tampón pH 3	26,21	ND

ND: No se detectan aromas

* Presencia de catequinas

NA: No se puede analizar

** Volumen de elución insuficiente para eluir analitos

Haciendo una comparación global de las concentraciones de aromas libres y precursores aromáticos que se muestran en la tabla anterior, se concluye que el método analítico, comprendido por las etapas de extracción y análisis de los aromas, ha de realizarse en las condiciones que se exponen a continuación:

- El disolvente de extracción elegido para la extracción sólido – líquido es la disolución tampón de ácido cítrico a pH 3 ya que se minimizan las interferencias debidas a la extracción de polifenoles y es compatible con el procedimiento SPE. En el estudio elaborado por Genovese, Gambuti, Lamorte & Moio (2013) se concluye igualmente que la disolución tampón a pH 3 es el disolvente de extracción más adecuado frente al uso de disoluciones hidroalcohólicas, independientemente del porcentaje de alcohol contenido en las mismas.
- El volumen de carga de muestra en el cartucho SPE seleccionado es de 20 ml. Tanto las concentraciones de aromas como la intensidad de los picos cromatográficos son mayores frente a los otros volúmenes estudiados (10 ml, 30 ml y 50 ml). Las relaciones volumen de carga:volumen de elución seleccionadas son 1:0,8 para el análisis de precursores aromáticos (correspondiente a un volumen de elución de 16 ml de metanol) y 2:1 para el análisis de aromas libres (correspondiente a un volumen de elución de 10 ml de diclorometano).

Comparando estos resultados con otros estudios, los volúmenes de carga son distintas dadas las diferencias en las características de los cartuchos empleados y en la cantidad de relleno de los mismos. En el estudio elaborado por Genovese et al. (2013), se emplea un cartucho C-18 con 10 g de relleno y el volumen de carga es de 250 ml. Sin embargo, en los estudios elaborados por Ghaste et al. (2015) y Vrhovsek et al. (2014) se emplean cartuchos Isolute ENV+ y los volúmenes de carga correspondientes son de 80 ml y 110 ml respectivamente.

En relación a las relaciones volumen de carga:volumen de elución, éstas son mucho mayores en las determinadas en este trabajo. Para la elución de aromas libres, las relaciones volumen de carga:volumen de elución aplicadas son de 4:1 (Vrhovsek et al., 2014; Ghaste, et al. 2015) y 5:1 (Genovese et al., 2013). Para la elución de precursores aromáticos, las relaciones volumen de carga:volumen de elución aplicadas son de 4:1 (Vrhovsek et al., 2014), 5:1 (Genovese et al., 2013) y 8:3 (Ghaste, et al. 2015).

En relación a la caracterización de los compuestos volátiles determinados, se ha observado que:

- Los precursores aromáticos glicosilados más abundantes en los orujos de uva son, en orden descendente, alcohol bencílico, 3-metil-butanol, decanoato de metilo y hexadecanoato de metilo.
- Los aromas libres más abundantes en los orujos de uva son, en orden descendente, alcohol bencílico, 3-metil-butanol, 1-hexanol y ácido hexanoico.

De acuerdo a estos datos y como se describe en el apartado 1.2 de esta memoria, los compuestos volátiles que se liberan de los precursores glicosídicos son de la misma naturaleza que los aromas libres. Asimismo, los aromas que contienen los orujos de uva con los que se trabaja pertenecen mayoritariamente a las familias de alcoholes, ésteres y ácidos.

Comparando la composición aromática de los orujos de uva con la composición aromática de la uva (Canuti et al., 2009; Genovese et al., 2013; Ghaste et al., 2015), tanto en la uva como en los orujos de uva el alcohol bencílico y 3-metil-butanol son aromas libres mayoritarios y, el alcohol bencílico es el precursor aromático por excelencia. Sin embargo, el total de compuestos volátiles presentes en la uva es mucho mayor que en los orujos de uva, como cabe esperar tras someterlas al proceso de vinificación.

5.3. Determinación de los factores de mayor influencia en la extracción de aromas

Con el fin de encontrar las condiciones de extracción que permitan recuperar el mayor potencial aromático en los extractos de orujos de uva, se plantea un diseño de superficie de respuesta. Para ello, es necesario determinar qué factores afectan de forma relevante en la extracción de aromas. Es por ello que se realizan previamente un breve diseño factorial incompleto, a partir del cual se seleccionan los factores que posteriormente se emplean para el diseño de superficie respuesta.

Los factores experimentales que se han variado han sido el tratamiento previo de la muestra, el tamaño de partícula de los orujos de uva, el pH del disolvente de extracción, la temperatura a la que se lleva a cabo la extracción y la relación sólido:solvente.

Con los datos recopilados en la bibliografía y estudios previos realizados, los niveles estudiados para cada uno de los factores son los siguientes:

- Los tratamientos previos a los que se someten las muestras son secado a vacío y liofilización; con el fin de determinar cuál de los dos ofrece mejores resultados en relación al potencial aromático de los orujos de uva.
- El tamaño de partícula afecta ampliamente en la extracción de polifenoles en orujos de uva (Casazza, Aliakbarian, De Faveri, Fiori, & Perego, 2012; Pinelo, Del Fabbro, Manzocco, Nuñez, & Nicoli, 2005), por lo que se estudia si también afecta a la extracción de aromas. Los niveles máximo y mínimo se han determinado tamizando las muestras (secadas a vacío o liofilizadas) y molidas, de modo que los dos intervalos de tamaño de partícula para los que se recupera un mayor porcentaje de muestra son $710\ \mu\text{m} < x < 2,5\ \text{mm}$ y $200\ \mu\text{m} < x < 450\ \mu\text{m}$.
- Los pH de las disoluciones de extracción empleadas son 3 y 6 respectivamente. En el estudio realizado por Genovese, Gambuti, Lamorte, & Moio (2013), se trabaja a pH 3 y a pH 7. En él se concluye que, a pH 3, el rendimiento de extracción es mayor que a pH 7. Asimismo, en el estudio realizado por Gunata, Bayonove, Baumes, & Cordonnier (1985), se trabaja a pH 5 y se obtienen buenos resultados.

Los pH a los que se trabaja se encuentran dentro del rango óptimo en SPE, es decir, entre pH 2 y pH 8. Por ello, con el fin de aumentar el espacio experimental, se ha trabajado a pH 3 y a pH 6.

- La temperatura a la cual se lleva cabo la extracción de aromas en la bibliografía es generalmente a 20 – 25 °C si posteriormente se realiza SPE. No obstante, en HS – SPME, la extracción se realiza a 40 – 50 °C, sin destruir los compuestos aromáticos. Por lo tanto, en este caso se ha trabajado a 20 °C y a 50 °C.
- La relación sólido:solvente varía considerablemente de unos estudios a otros, de 1:1 (Canuti et al., 2009; Pedroza et al., 2010; M. R. Salinas et al., 2012) a 1:7 (Genovese et al., 2013), pasando por 1:3 (Ghaste et al., 2015).

Con las muestras molidas y tamizadas (50 g) no se puede trabajar con una relación sólido solvente 1:1 ni 1:2, ya que el sólido absorbe el disolvente y no es posible recuperarlo en la centrifugación posterior a la extracción; obteniéndose un extracto sólido húmedo, sin líquido.

Por lo tanto, las relaciones sólido:solvente a las que se ha trabajado han sido 1:3 y 1:7, correspondientes a la adición de 150 ml y 350 ml de disolvente respectivamente.

Dado que el interés es obtener extractos con un elevado potencial aromático, las variables respuesta medidas han sido las concentraciones totales de aromas libres y de precursores aromáticos respectivamente.

Se han llevado a cabo 16 experimentos, 8 de ellos empleando orujos de uva secados a vacío y otros 8 empleando orujos de uva liofilizados, utilizando un diseño factorial incompleto de tipo media fracción (2^{4-1}), aleatorizado y sin repeticiones, para el estudio de los efectos principales y las interacciones de los cuatro factores estudiados (tamaño de partícula, pH del disolvente de extracción, temperatura de extracción y relación sólido:solvente), a 2 niveles cada uno (Tablas 5.9 y 5.10).

Tabla 5. 9. Valores de los factores utilizados en el diseño experimental
(diseño factorial incompleto, media fracción: 2^{4-1})

Valor	Tamaño de partícula (mm)	pH	Temperatura (°C)	Relación sólido:solvente
-1	$0,20 < x < 0,45$	3	20	1:3
1	$0,71 < x < 2,50$	6	50	1:7

Tabla 5. 10. Diseño experimental para los orujos de uva secados a vacío y liofilizados

Prueba	Tamaño de partícula	pH	T ^a (°C)	Relación sólido:solvente
1	1,0	-1,0	-1,0	1,0
2	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,0	-1,0	1,0	-1,0
4	1,0	1,0	-1,0	-1,0
5	-1,0	-1,0	1,0	1,0
6	-1,0	1,0	-1,0	1,0
7	-1,0	1,0	1,0	-1,0
8	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0

En las Tablas 5.11 a 5.16 se muestran los resultados de los 16 experimentos llevados a cabo.

Tabla 5. 11. Resultados del diseño experimental aplicado a la determinación de aromas libres en orujos de uva secados a vacío

	Prueba							
AROMAS LIBRES (mg/kg)	1	2	3	4	5	6	7	8
3-metil-butanol	21,50	0,00	0,00	0,00	6,17	0,00	0,00	0,97
1-hexanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
butanodiato de dietilo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3-hidroxi-butanoato de etilo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,11
ácido hexanoico	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
alcohol bencílico	96,80	49,03	23,94	23,13	60,80	32,24	53,05	52,76
TOTAL (mg/kg)	118,30	49,03	23,94	23,13	66,97	32,24	53,05	55,84

Tabla 5. 12. Resultados del diseño experimental aplicado a la determinación de precursores aromáticos en orujos de uva secados a vacío

	Prueba							
PRECURSORES AROMÁTICOS (mg/kg)	1	2	3	4	5	6	7	8
alcohol bencílico	1,38	2,02	0,74	2,10	3,12	3,22	0,27	0,95
hexadecanoato de metilo	0,00	2,24	0,48	0,51	1,68	3,17	0,17	0,62
2,6-bis-(1,1-dimetiletil)-fenol	0,00	2,44	0,00	0,50	1,76	3,02	0,19	0,00
3,7-dimetil-6-octenol	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,80
(Z,Z)-metil-9,12-ácido octadecadienicoico	0,00	2,34	0,00	0,00	1,75	5,20	0,00	0,00
TOTAL (mg/kg)	1,38	9,04	1,22	3,10	9,30	14,60	0,63	2,37

Tabla 5. 13. Resultados del diseño experimental aplicado a la determinación de aromas libres en orujos de uva liofilizados

AROMAS LIBRES (mg/kg)	Prueba							
	1	2	3	4	5	6	7	8
3-metil-butanol	39,20	32,74	10,53	7,05	9,99	8,38	10,96	17,18
1-hexanol	2,52	4,36	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50	0,00
butanodiato de dietilo	0,00	0,00	1,12	0,00	0,00	0,00	0,00	1,18
3-hidroxi-butanoato de etilo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
ácido hexanoico	0,00	2,44	1,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
alcohol bencílico	57,49	70,90	21,76	29,75	58,41	52,67	20,40	56,62
TOTAL (mg/kg)	99,21	110,44	34,71	36,80	68,40	61,05	32,87	74,98

Tabla 5. 14. Resultados del diseño experimental aplicado a la determinación de precursores aromáticos en orujos de uva liofilizados

PRECURSORES AROMÁTICOS (mg/kg)	Prueba							
	1	2	3	4	5	6	7	8
alcohol bencílico	1,43	2,41	0,46	0,53	3,96	16,81	0,00	0,00
hexadecanoato de metilo	0,67	1,86	0,44	0,24	2,06	0,00	0,00	0,00
2,6-bis-(1,1-dimetiletil)-fenol	0,88	1,43	0,16	0,00	0,00	0,62	0,00	0,00
3,7-dimetil-6-octenol	0,00	0,00	0,00	0,00	1,82	0,00	0,00	0,00
(Z,Z)-metil-9,12-ácido octadecadienicoico	0,00	0,00	0,00	0,00	1,88	0,00	0,00	0,00
TOTAL (mg/kg)	2,98	5,70	1,06	0,77	9,72	17,42	0,00	0,00

Tabla 5. 15. Tabla resumen de los resultados del diseño experimental aplicado a orujos de uva secados a vacío

Prueba	Tamaño de partícula	pH	Tª (°C)	Relación sólido:solvente	Conc. de aromas libres (mg/kg)	Conc. de precursores aromáticos (mg/kg)
1	1,0	-1,0	-1,0	1,0	118,30	1,38
2	1,0	1,0	1,0	1,0	49,03	9,04
3	1,0	-1,0	1,0	-1,0	23,94	1,22
4	1,0	1,0	-1,0	-1,0	23,13	3,10
5	-1,0	-1,0	1,0	1,0	66,97	9,30
6	-1,0	1,0	-1,0	1,0	32,24	14,60
7	-1,0	1,0	1,0	-1,0	53,05	0,63
8	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	55,84	2,37

Tabla 5. 16. Tabla resumen de los resultados del diseño experimental aplicado a orujos de uva liofilizados

Prueba	Tamaño de partícula	pH	Tª (°C)	Relación sólido:solvente	Conc. de aromas libres (mg/kg)	Conc. de precursores aromáticos (mg/kg)
1	1,0	-1,0	-1,0	1,0	99,21	2,98
2	1,0	1,0	1,0	1,0	110,44	5,70
3	1,0	-1,0	1,0	-1,0	34,71	1,06
4	1,0	1,0	-1,0	-1,0	36,80	0,77
5	-1,0	-1,0	1,0	1,0	68,40	9,72
6	-1,0	1,0	-1,0	1,0	61,05	17,42
7	-1,0	1,0	1,0	-1,0	32,87	0,00
8	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	74,98	0,00

A partir de los resultados obtenidos, se observa que la concentración de aromas libres extraídos es mucho mayor que la concentración de precursores aromáticos glicosilados. Por ello, se puede deducir que los orujos de uva con los que se trabaja contienen un porcentaje mayor de aromas libres que de precursores aromáticos glicosilados después del proceso de vinificación, puesto que en este proceso se pueden hidrolizar los precursores aromáticos presentes en la uva.

En relación a la caracterización de los aromas, se observa que, tanto en los orujos secados a vacío como liofilizados, los aromas mayoritarios son el alcohol bencílico, que representa más del cincuenta por ciento de la concentración de aromas libres y de precursores aromáticos en todas las pruebas, 3-metil-butanol en forma de aroma libre y hexadecanoato de metilo y 2,6-bis-(1,1-dimetiletil)-fenol en forma de precursor aromático.

En el análisis estadístico de los resultados de los datos de las Tablas 5.15 y 5.16 se obtienen las siguientes conclusiones:

- **Orujos de uva secados a vacío**

En la determinación de los aromas libres, ninguno de los factores estudiados es significativo, pero temperatura y pH son los más influyentes en todos los casos. En la Figura 5.1 se muestran el diagrama de Pareto y la gráfica de efectos principales correspondientes al modelo que permite explicar una mayor variabilidad de los resultados (97,4932 %).

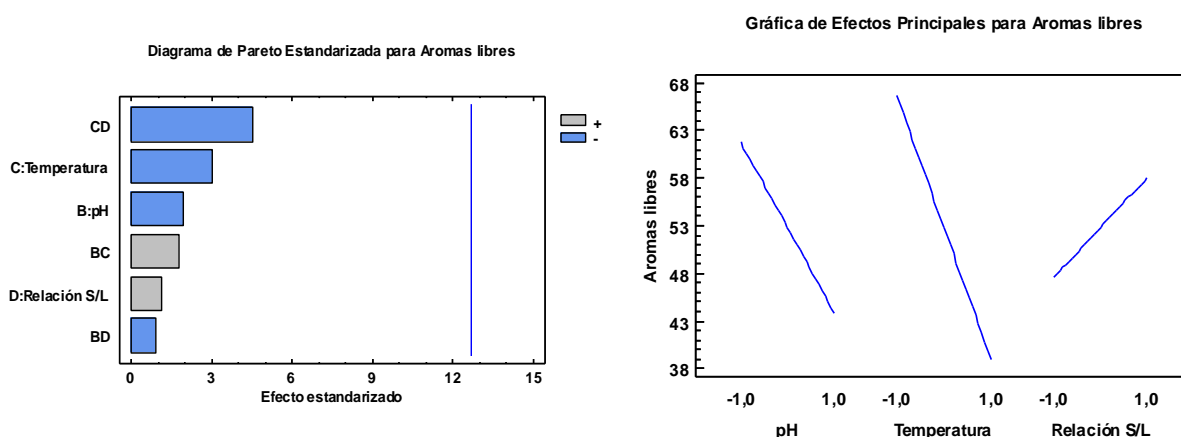


Figura 5. 1. Diagrama de Pareto y gráfica de efectos principales para la determinación de aromas libres en orujos secados a vacío

En la determinación de los precursores aromáticos glicosilados, la temperatura presenta una influencia significativa en la extracción de los mismos. Asimismo, el pH, que no es significativo, también afecta en la extracción, pero en menor medida que la temperatura. En la Figura 5.2 se muestran el diagrama de Pareto y la gráfica de efectos principales correspondientes al modelo que permite explicar una mayor variabilidad de los resultados (99,8747 %).

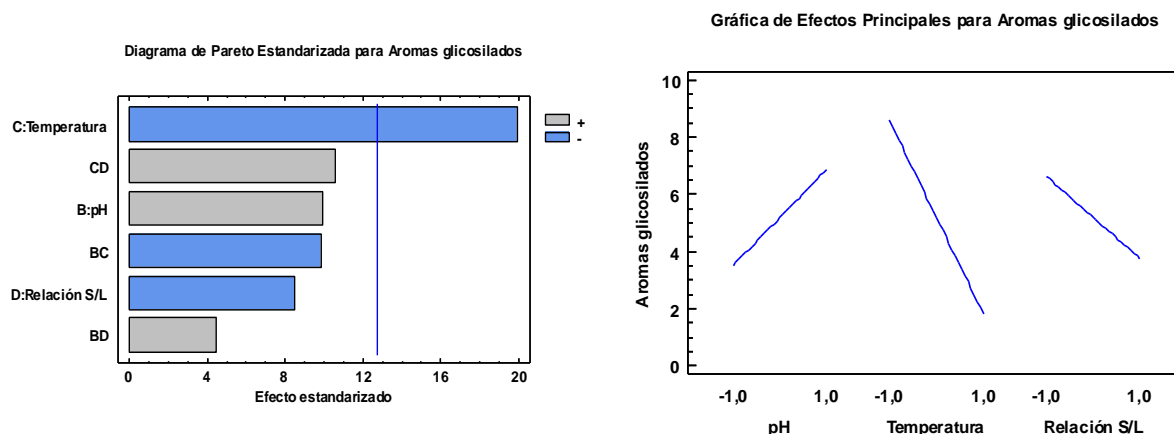


Figura 5. 2. Diagrama de Pareto y gráfica de efectos principales para la determinación de precursores aromáticos glicosilados en orujos secados a vacío

• Orujos de uva liofilizados

En la determinación de los aromas libres, la temperatura presenta una influencia significativa en la extracción de los mismos. Asimismo, el pH, que no es significativo, también afecta en la extracción, pero en menor medida que la temperatura. En la Figura 5.2 se muestran el diagrama de Pareto y la gráfica de efectos principales correspondientes al modelo que permite explicar una mayor variabilidad de los resultados (86,4709 %).

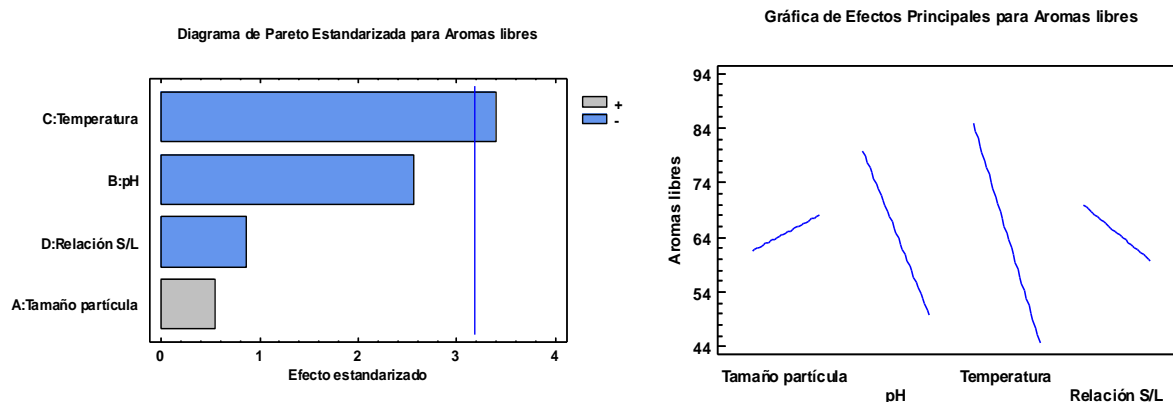


Figura 5. 3. Diagrama de Pareto y gráfica de efectos principales para la determinación de aromas libres en orujos liofilizados

En la determinación de los precursores aromáticos glicosilados, la temperatura presenta una influencia significativa en la extracción de los mismos. Asimismo, el pH, que no es significativo, también afecta en la extracción, pero en menor medida que la temperatura. En la Figura 5.2 se muestran el diagrama de Pareto y la gráfica de efectos principales correspondientes al modelo que permite explicar una mayor variabilidad de los resultados (74,9178 %).

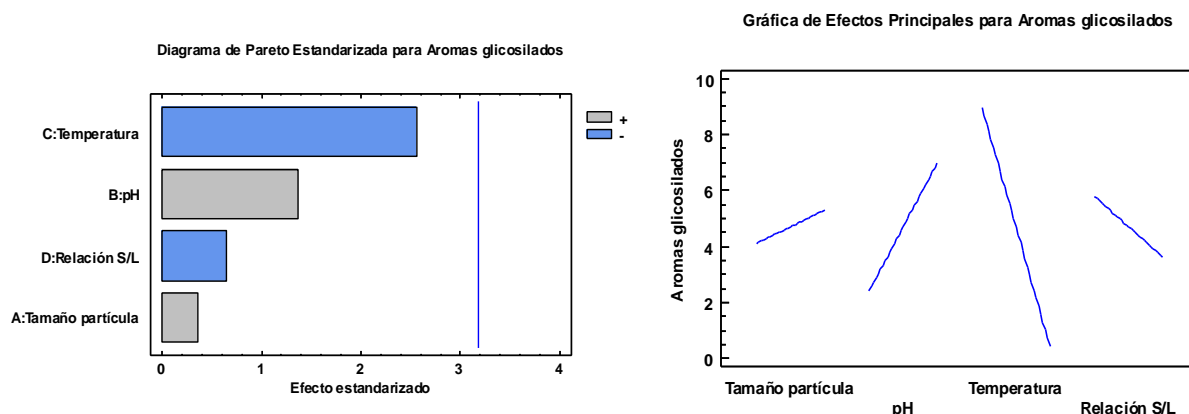


Figura 5. 4. Diagrama de Pareto y gráfica de efectos principales para la determinación de precursores aromáticos glicosilados en orujos liofilizados

Las gráficas de efectos principales expuestas en las Figuras 5.1 a 5.4 muestran que, la extracción de aromas libres en los orujos secados a vacío y liofilizados se ve favorecida a pH y temperatura baja (pH 3 y 20 °C), mientras que se extrae una mayor concentración de precursores aromáticos a pH alto y temperatura baja (pH 6 y 20 °C). El tamaño de partícula y la relación sólido:solvente no presentan una influencia destacable en la extracción de aromas, pero sí se observan ciertas discrepancias en los resultados respecto a la relación sólido:solvente, ya que en el caso de los aromas en orujos liofilizados y los precursores aromáticos en orujos secados a vacío las concentraciones obtenidas son mayores a relación sólido:solvente 1:3, mientras que en el caso de los aromas libres en orujos secados a vacío, su concentración es mayor cuando la extracción se realiza a relación sólido:solvente 1:7.

5.4. Optimización de las condiciones de extracción

Para la determinación de las condiciones óptimas de extracción se trabaja en las siguientes condiciones, tomando como factores para el diseño experimental pH y temperatura exclusivamente, puesto que son los factores de mayor influencia en la extracción de aromas:

- El tratamiento previo que se aplica a los orujos de uva es secado a vacío puesto que, por un lado, las diferencias en la concentración de aromas obtenidas entre ambos tratamientos previos de secado de los orujos de uva son mínimas y, por otro lado, el coste económico asociado a este tratamiento es mucho menor.
- En lugar de tamizar las muestras secadas para separarlas en función del tamaño de partícula, tras el proceso de secado, se trituran los orujos con una batidora y se toma toda la muestra obtenida, ya que el tamaño de partícula no afecta significativamente en la extracción.
- Se trabaja con una relación sólido:solvente correspondiente a 1:7 puesto que se extrae una concentración de aromas libres superior en los orujos secados a vacío.

La variable respuesta estudiada en el diseño experimental de superficie de respuesta es la concentración de aromas libres, presentes en los orujos de uva en una proporción muy superior a los precursores aromáticos de acuerdo a los resultados obtenidos con el método analítico diseñado en este estudio.

Se han llevado a cabo 16 experimentos, utilizando un diseño experimental de superficie de respuesta de tipo 2^2 + estrella aleatorizado y sin repeticiones (Tabla 5.18), para el estudio de los efectos principales y las interacciones de los dos factores estudiados (pH del disolvente de extracción y temperatura de extracción) a 5 niveles cada uno (Tabla 5.17).

Tabla 5. 17. Valores de los factores utilizados en el diseño experimental (diseño central compuesto en estrella, 2^2 + estrella)

Valor	Temperatura (°C)	pH
- 1,41	14	2,4
-1	20	3
0	35	4,5
1	50	6
1,41	56	6,6

Tabla 5. 18. Diseño experimental para los orujos de uva secados a vacío

Prueba	Temperatura (°C)	pH
1	0,0	1,41
2	0,0	-1,41
3	0,0	0,0
4	1,0	1,0
5	0,0	0,0
6	0,0	0,0
7	0,0	0,0
8	1,0	-1,0

Prueba	Temperatura (°C)	pH
9	-1,0	-1,0
10	0,0	0,0
11	-1,41	0,0
12	1,41	0,0
13	0,0	0,0
14	0,0	0,0
15	0,0	0,0
16	-1,0	1,0

En la Tabla 5.19 se muestran las concentraciones de cada uno de los aromas libres determinados en este diseño experimental y en la Tabla 5.20 se muestran los resultados obtenidos en los 16 experimentos llevados a cabo en forma resumida. En esta experiencia, la determinación cromatográfica se ha realizado empleando el equipo GC – FID en las condiciones expuestas en la Tabla 4. 2 y partiendo del calibrado de aromas que se muestra en la Tabla 4.3 para la identificación de los aromas extraídos de los orujos.

Tabla 5. 19. Resultados del diseño experimental de superficie de respuesta

AROMAS LIBRES (mg/kg)	Prueba							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1-butanol	1,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3-metil-butanol	8,71	5,22	2,20	26,62	4,26	6,69	6,20	38,47
Acetato de hexilo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lactato de etilo	7,86	8,64	2,17	8,77	1,80	4,02	7,78	12,85
cis-3-hexenol	5,50	5,10	0,92	0,00	0,85	0,59	5,86	1,81
Octanoato de etilo	0,35	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Benzaldehído	2,40	0,53	0,00	0,00	0,34	0,00	0,93	1,14
γ -butirolactona	9,63	2,75	0,00	0,00	0,00	1,09	2,58	0,00
Succinato de dietilo	11,43	5,44	2,01	2,53	3,56	2,53	2,86	16,07
Glutarato de dietilo	1,35	1,32	2,29	2,34	3,87	0,38	3,79	7,11
Ácido hexanoico	1,76	1,25	0,35	1,28	0,63	0,78	1,13	1,55
2-feniletanol	24,64	25,76	17,66	34,96	26,64	27,68	22,38	42,97
TOTAL	75,34	56,37	27,60	76,50	41,96	43,76	53,51	121,97

AROMAS LIBRES (mg/kg)	Prueba							
	9	10	11	12	13	14	15	16
1-butanol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3-metil-butanol	3,87	12,24	22,10	15,53	3,99	6,11	3,76	3,89
Acetato de hexilo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lactato de etilo	1,81	3,33	6,11	6,20	0,00	8,24	6,23	1,97
cis-3-hexenol	0,96	0,00	1,91	0,00	0,00	5,07	4,54	0,83
Octanoato de etilo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Benzaldehído	0,63	1,36	0,51	0,92	0,00	0,40	0,70	0,76
γ -butirolactona	0,00	0,00	4,58	0,00	3,68	0,00	4,31	0,00
Succinato de dietilo	4,54	7,84	1,75	0,00	2,01	7,39	6,02	5,10
Glutarato de dietilo	3,54	3,84	1,92	1,53	0,71	1,46	1,20	4,18
Ácido hexanoico	0,59	0,70	1,08	0,88	0,41	1,15	1,19	0,67
2-feniletanol	27,95	21,82	31,10	20,21	8,32	21,74	14,94	22,26
TOTAL	43,89	51,14	71,06	45,27	19,12	51,55	42,89	39,68

Tabla 5. 20. Resumen de las concentraciones de aromas libres determinadas para los orujos de uva secados a vacío en el diseño experimental de superficie de respuesta

Prueba	Temperatura	pH	Conc. aromas libres (mg/kg)
1	35	6,6	75,34
2	35	2,4	56,37
3	35	4,5	27,60
4	50	6	76,50
5	35	4,5	41,96
6	35	4,5	43,76
7	35	4,5	53,51
8	50	3	121,97
9	20	3	43,89
10	35	4,5	51,14
11	14	4,5	71,06
12	56	4,5	45,27
13	35	4,5	19,12
14	35	4,5	51,55
15	35	4,5	42,89
16	20	6	39,68

En las tablas anteriores se observa que los principales compuestos volátiles que constituyen la fracción de aromas libres son el 2-feniletanol, que representa aproximadamente el 50 % de la concentración de aromas, seguido del 3-metil-butanol y succinato de dietilo.

El software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI.II se ha utilizado para determinar la ecuación del modelo ajustado a partir de la cual se calcula la concentración de aromas libres:

$$y = 141,01 - 43,19 \cdot x_1 - 0,55 \cdot x_2 + 6,37 \cdot x_1^2 - 0,46 \cdot x_1 \cdot x_2 + 0,05 \cdot x_2^2$$

Donde:

y = variable respuesta a modelizar (concentración de aromas libres)

x_1 = variable independiente pH

x_2 = variable independiente temperatura

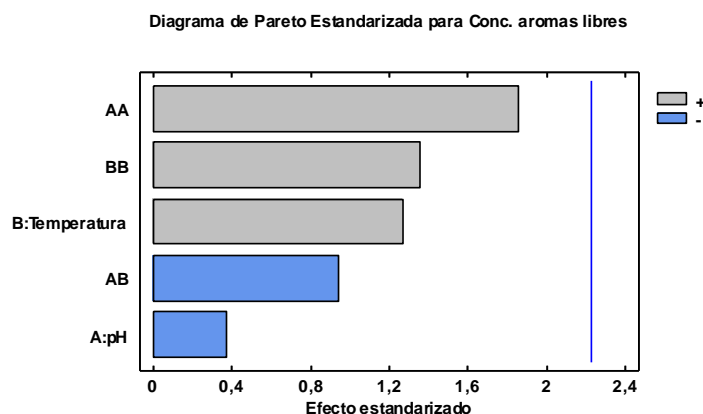
El análisis de la varianza para los modelos obtenidos de la variable respuesta bajo diferentes condiciones de pH y temperatura está presentado en la Tabla 5.21.

Tabla 5. 21. R^2 y p-valor de la variable respuesta

Término	P – valor
A:pH	0,7194
B:Temperatura	0,2334
AA	0,0934
AB	0,3676
BB	0,2047
R^2	0,4418

Analizando los resultados de la tabla anterior, el modelo de superficie de respuesta obtenido explica tan sólo un 44,18% de la variabilidad de los datos correspondientes a la concentración de aromas libres.

En la Figura 5.5. se muestra el nivel de significatividad de las variables estudiadas y sus efectos principales (AA, AB y BB).

**Figura 5. 5.** Significación de la T^a y pH en la extracción de aromas en orujos secados a vacío

Observando la figura anterior, los datos del p – valor contenidos en la Tabla 5.20 y el gráfico de superficie de respuesta obtenido en el diseño (Figura 5.4), se concluye que los factores pH y temperatura influyen en la extracción de aromas libres en orujos de uva secados a vacío; si bien esta influencia no es estadísticamente significativa.

Asimismo, se han determinado las condiciones de pH y temperatura óptimas para la extracción de acuerdo al modelo de superficie de respuesta diseñado. En la Figura 5.6 se muestra la gráfica de superficie de respuesta obtenida. La concentración de aromas viene representada frente al pH y la temperatura, cuyas unidades correspondientes a las condiciones de tratamiento están codificadas según se explica en la Tabla 5.16.

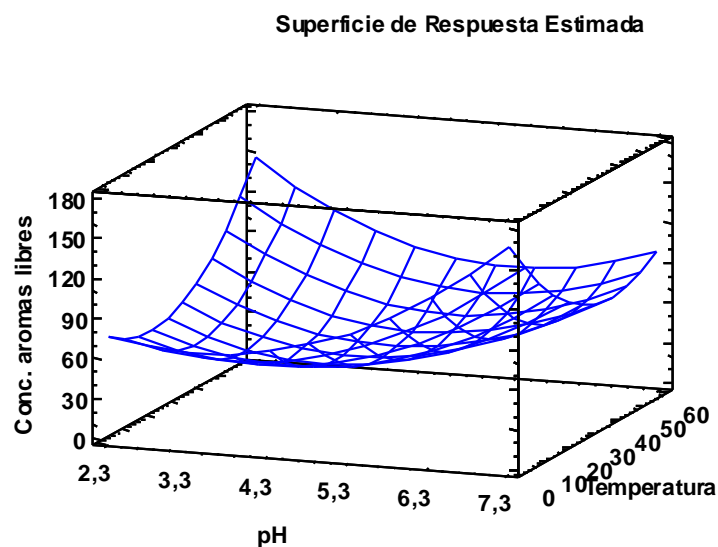


Figura 5. 6. Gráfica de superficie de respuesta correspondiente a la concentración de aromas libres en orujos de uva secados a vacío

En la gráfica se observa que a pH bajo y temperatura elevada se alcanzan los mayores valores de concentración de aromas libres. Por lo tanto, los valores óptimos de pH y temperatura para maximizar el potencial aromático de los orujos de uva son:

- **pH óptimo: 2,4**
- **Temperatura óptima: 56 °C**

Teniendo en cuenta estas condiciones para la extracción sólido, la respuesta pronosticadas para la concentración de aromas libres en orujos de uva secados a vacío es de **138,22 mg/ kg orujos de uva**.

No obstante, atendiendo a la gráfica de superficie de respuesta, también se podría trabajar a pH alto y temperatura baja, aunque posiblemente variaría el tipo de aromas recuperados.

CONCLUSIONES

Este trabajo se ha estructurado partiendo de cuatro objetivos, de los cuales se extraen las siguientes conclusiones:

1. La extracción de aromas libres y precursores aromáticos presentes en los orujos de uva se ve favorecida por la disolución tampón a pH 3 frente al uso de etanol:agua (50:50, v:v). Asimismo, con este disolvente se minimizan las interferencias debidas a la extracción de polifenoles y es compatible con el procedimiento de extracción en fase sólida diseñado.
2. Las condiciones del procedimiento de extracción en fase sólida que proporcionan los mejores resultados en relación a la concentración de aromas corresponden a un volumen de carga de 20 ml y relaciones volumen de carga:volumen de elución de 2:1 y 1:0,8 para el análisis de aromas libres y de precursores aromáticos respectivamente.
3. Los factores de mayor influencia en la extracción sólido – líquido son la temperatura y el pH, independientemente del tratamiento de secado que se aplique a las muestras (secado a vacío o liofilización). Las condiciones de extracción fijadas para maximizar la recuperación de los aromas presentes en los orujos son un pH en el medio de 2,4 y una temperatura de extracción de 56 °C.
4. Los principales aromas libres determinados en los orujos de uva son, en orden descendente, alcohol bencílico, 3–metil-butanol, 1-hexanol y ácido hexanoico, los principales precursores aromáticos determinados, en orden descendente, son alcohol bencílico, 3–metil-butanol, decanoato de metilo y hexadecanoato de metilo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC 920.149. (2005). AOAC Método Oficial 920.149 Preparación de muestras de fruta para análisis.
- AOAC 940.26. (2005). 37.1.18 AOAC Método Oficial 940.26 Cenizas en frutas y derivados.
- AOAC 942.15. (2005). AOAC Método Oficial 942.15 Acidez titulable en frutas.
- Balasubramanian, S., & Panigrahi, S. (2011). Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 4(1), 1–26. <http://doi.org/10.1007/s11947-009-0299-3>
- Berrocal, D. I. I. (2012). Captura Y Caracterización de compuestos aromáticos volátiles en alimentos cocinados. Estudio preliminar. *Universidad Politécnica de Cartagena*.
- Canuti, V., Conversano, M., Calzi, M. L., Heymann, H., Matthews, M. A., & Ebeler, S. E. (2009). Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *Journal of Chromatography. A*, 1216(15), 3012–22. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.104>
- Casazza, A. A., Aliakbarian, B., De Faveri, D., Fiori, L., & Perego, P. (2012). Antioxidants from winemaking wastes: A study on extraction parameters using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry*, 36(1), 28–37. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00511.x>
- Castro, R., Natera, R., Durán, E., & García-Barroso, C. (2008). Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products. *European Food Research and Technology*, 228(1), 1–18. <http://doi.org/10.1007/s00217-008-0900-4>
- Cedrón Fernández, M. T. (2004). Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. *Universidad de La Rioja*. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Coelho, Rocha, Delgadillo & Coimbra, (2006). Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. ‘Baga’ ripening. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 204-214, <http://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.018>
- Davidov-Pardo, G., Navarro, M., Arozarena, I., & Marin-Arroyo, M. (2014). Obtaining Polyphenolic Extracts from Wine By-Products. *Grapes. Production, Phenolic Composition and Potential Biomedical Effects*, 225–244.
- Diéguez, S.C., Lois, L.C., Gómez, E.F. & Peña, M.L.G. (2003). Aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Albariño. *LWT - Food Science & Technology*, 36(6), 585-590. [http://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00064-1](http://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00064-1)
- Famuyiwa, O., & Ough, C. S. (1982). Grape Pomace: Possibilities as Animal Feed. *American Journal of Enology and Viticulture*, 33(1), 44–46. Retrieved from <http://www.ajevonline.org/content/33/1/44.abstract>

FEDNA (2016). Orujos de uva.

http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/orujo-de-uva

Fernández, J. (2006). Los residuos de las agroindustrias como biocombustibles sólidos (I). *Vida Rural*, 233, 14–18.

Fragasso, M., Antonacci, D., Pati, S., Tufariello, M., Baiano, A., Forleo, L. R., Bertrand, A. (2002). Determination of volatile compounds in Grenache wines in relation with different terroirs in the Rhone Valley. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(22), 6341–6345. <http://doi.org/10.5344/ajev.2012.11074>

Genovese, A., Gambuti, A., Lamorte, S. A., & Moio, L. (2013). An extract procedure for studying the free and glycosilated aroma compounds in grapes. *Food Chemistry*, 136(2), 822–34. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.061>

Ghaste, M., Narduzzi, L., Carlin, S., Vrhovsek, U., Shulaev, V., & Mattivi, F. (2015). Chemical composition of volatile aroma metabolites and their glycosylated precursors that can uniquely differentiate individual grape cultivars. *Food Chemistry*, 188, 309–19. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.056>

González-Rodríguez, R. M., Noguerol-Pato, R., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2011). Application of new fungicides under good agricultural practices and their effects on the volatile profile of white wines. *Food Research International*, 44(1), 397–403. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.036>

Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., & Cordonnier, R. E. (1985). The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. Muscat during first development and maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(9), 857–862. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2740360915>

Gunata, Y. Z., Bayonove, C. L., Baumes, R. L., & Cordonnier, R. E. (1985). The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *Journal of Chromatography A*, 331(C), 83–90. [http://doi.org/10.1016/0021-9673\(85\)80009-1](http://doi.org/10.1016/0021-9673(85)80009-1)

López, R., Cacho, J. (2011). Avances en la cromatografía de gases aplicada al análisis de compuestos volátiles en el vino. *ACEnología*, http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/cromatografia_gas_volatiles_2cienc0211.htm

López, R., Ezpeleta, E., Sánchez, I., Cacho, J. & Ferreira, V. (2004). Analysis of the aroma intensities of volatile compounds released from mild acid hydrolysates of odourless precursors extracted from Tempranillo and Grenache grapes using gas chromatography-olfactometry. *Food Chemistry*, 88 (1), 95-103, <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.025>

López Vázquez, C. (2011). Estudio del comportamiento de columnas de destilación en la elaboración de aguardientes de orujo. Características analíticas y sensoriales de los destilados (Vol. 2). *Universidad de Santiago de Compostela*.

- Martinez, G. A., Rebecchi, S., Decorti, D., Domingos, J. M. B., Natolino, A., Del Rio, D., Fava, F. (2015). Towards multi-purpose biorefinery platforms for the valorisation of red grape pomace: production of polyphenols, volatile fatty acids, polyhydroxyalkanoates and biogas. *Green Chem.*, 261–270. <http://doi.org/10.1039/C5GC01558H>
- Martínez-Gil, A. M., Garde-Cerdán, T., Zalacain, A., Pardo-García, A. I., & Salinas, M. R. (2012). Applications of an oak extract on Petit Verdot grapevines. Influence on grape and wine volatile compounds. *Food Chemistry*, 132(4), 1836–1845. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.016>
- Ministerio de Agricultura. (1979). Orujos de vinificación en la alimentación de rumiantes. *Hojas Divulgadoras*, 9.
- Noguerol-Pato, R., González-Álvarez, M., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B. & Simal-Gándara, J. (2013). Evolution of the aromatic profile in Garnacha Tintorera grapes during raisining and comparison with that of the naturally sweet wine obtained. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1052–1061, <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.048>
- Panighel, A., & Flamini, R. (2014). Applications of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS) in the study of grape and wine volatile compounds. *Molecules*, 19(12), 21291–21309. <http://doi.org/10.3390/molecules191221291>
- Pedroza, M. A., Zalacain, A., Lara, J. F., & Salinas, M. R. (2010). Global grape aroma potential and its individual analysis by SBSE–GC–MS. *Food Research International*, 43(4), 1003–1008. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.008>
- Picó, Y., Fernández, M., Ruiz, M. J., & Font, G. (2007). Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 117–131. <http://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.10.010>
- Pinelo, M., Del Fabbro, P., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2005). Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chemistry*, 92(1), 109–117. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.015>
- Ruberto, G., Renda, A., Amico, V. & Tringali, C. (2008). Volatile components of grape pomaces from different cultivars of Sicilian *Vitis vinifera* L. *Bioresource Technology* 99(2), 260–268, <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.025>
- Sabon, I., De Revel, G., Kotseridis, Y., & Bertrand, A. (2002). Determination of volatile compounds in Grenache wines in relation with different terroirs in the Rhone Valley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6341–6345. <http://doi.org/10.1021/jf025611k>
- Salinas, M. R., de la Hoz, K. S., Zalacain, A., Lara, J. F., & Garde-Cerdán, T. (2012). Analysis of red grape glycosidic aroma precursors by glycosyl glucose quantification. *Talanta*, 89, 396–400. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.050>
- Salinas, M., Zalacain, A., Pardo, F., & Alonso, G. L. (2004). Stir bar sorptive extraction applied to volatile constituents evolution during *Vitis vinifera* ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4821–7. <http://doi.org/10.1021/jf040040c>

- Serrano de la Hoz, K. (2014). Determinación de precursores aromáticos glicosídicos de uvas , mostos y vinos , blancos y tintos . Aplicación en bodega. *Universidad de Castilla - La Mancha*.
- Serrano-de-la-Hoz, K., & Salinas, M. R. (2015). ¿Por qué es importante el potencial aromático de la uva? *Revista Enólogos*, 93(1), 42–47.
- Sousa, E. C., Uchôa-thomaz, A. M. A., Osvaldo, J., Carioca, B., Morais, S. M. De, Lima, A. De, Rodrigues, L. L. (2014). Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L .), Benitaka variety , grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science Technology*, 34(1), 135–142.
<http://doi.org/10.1590/S0101-20612014000100020>
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). GC y GC-MS : configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*, 2(3), 33–59. Retrieved from <http://www.scientiachromatographica.com/files/v2n3/v2n3a3.pdf>
- Tournour, H. H., Segundo, M. A., Magalhães, L. M., Barreiros, L., Queiroz, J., & Cunha, L. M. (2015). Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 74, 397–406.
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.055>
- Ullari, P.G. (2010). Transporte de masa en extracción fase sólido - líquido. Universidad Central de Ecuador.
- Vrhovsek, U., Lotti, C., Masuero, D., Carlin, S., Weingart, G., & Mattivi, F. (2014). Quantitative metabolic profiling of grape, apple and raspberry volatile compounds (VOCs) using a GC/MS/MS method. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 966, 132–9.
<http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.009>
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 221–237. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>